



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

王鹏, 吴群*, 徐岩

工业生物技术教育部重点实验室, 江南大学生物工程学院, 酿造微生物学及应用酶学研究室, 江苏 无锡 214122

摘要:【目的】揭示白酒酿造过程复杂微生物群落中的核心微生物群(core microbiota), 定量分析核心微生物群的环境调控因素。【方法】通过高通量测序揭示发酵过程中的微生物群落结构, 使用气相色谱-质谱联仪(GC-MS)测定发酵过程中的挥发性化合物。采用微生物群落与挥发性化合物轮廓关联分析获得风味代谢的功能微生物群(functional microbiota); 通过微生物共现性网络分析, 获得群落组成中的共现微生物群(co-occurring microbiota), 两类微生物群的集合即为白酒酿造的核心微生物群。利用冗余分析(redundancy analysis)和蒙特卡洛置换检验(Monte Carlo permutation test)研究每个环境因素对该核心微生物群的影响。【结果】白酒发酵过程中的核心微生物群主要包含 10 个属, 分别是 *Lactobacillus*、*Saccharomyces*、*Candida*、*Rhizopus*、*Saccharomycopsis*、*Pichia*、*Dipodascus*、*Bacillus*、*Thermoascus* 和 *Lactococcus*。冗余分析和蒙特卡洛置换检验表明, 化学因素(还原糖和乙醇)对核心微生物群的变化比物理因素(水分、温度和酸度)具有更加重要的影响作用, 此外物理-化学因素的相互作用对核心微生物群的驱动也有很大的影响。【结论】本研究揭示了白酒发酵过程中的微生物群落组成和代谢物轮廓的变化规律及其二者之间的相关关系, 确立了发酵过程中的核心微生物群并量化了影响核心微生物群变化的环境因素, 为实现合成微生物组生产白酒及其定向调控奠定理论基础。

关键词: 中国白酒, 高通量测序, 核心微生物群, 环境因素

多菌种参与的固态发酵被认为是一种古老、经济且对人体有益的食品发酵技术^[1]。由于多种微生物共同作用并具有复杂的代谢活力, 这种类型的发酵可以产生独特的食品风味和口感特征^[2]。通过寻找核心微生物群有利于人工构建合成微生物群落(synthetic microbial communities)并获得易操

作且可重复的发酵系统^[3-4]。目前从系统水平上寻找核心微生物并构建模拟的微生物群落来研究群落的性能和稳定性是常用的方法^[5]。有研究者发现, 不同国家的奶酪中具有稳定且丰度较高的微生物属, 如 *Staphylococcus*、*Brevibacterium*、*Brachy bacterium*、*Penicillium* 和 *Candida* 等。通过

基金项目: 国家自然科学基金(31530055); 国家重点研发计划(2016YFD0400503)

*通信作者。Tel/Fax: +86-510-85864112; E-mail: wuq@jiangnan.edu.cn

收稿日期: 2017-02-14; 修回日期: 2017-03-17; 网络出版日期: 2017-04-06

筛选相应的物种并人工构建奶酪皮, 证明了奶酪发酵过程中微生物群落聚集的动态变化具有一定的可操控性和可重复性^[6]。

寻找复杂发酵系统中的核心微生物群是构建模拟微生物群落的关键问题之一。目前寻找核心微生物群的方法可以归纳为以下几种: (1) 功能相关的微生物(functional microbiota)^[7-8], 如通过微生物群落和代谢物的相关性分析在食醋发酵中找到了由 7 个属组成的功能微生物群^[8]; (2) 丰度界定的优势微生物(dominant microbiota)^[6,9], 如 Hu 把平均相对丰度 > 1%且至少出现在一个样品以上的属定义为窖泥中的核心微生物属, 共鉴定出 17 个核心属^[9]; (3) 在样本中分布频率较大的普遍微生物群(ubiquitous microbiota)^[10-11], 如 Rui 等将至少分布在 90%的家用沼气池中的 OTU 定义为核心 OTU^[10]; (4) 共现性网络分析出共现的微生物群(co-occurring microbiota)^[12-13], 如 Barberan 等根据微生物的同现率(incidence of co-occurrence)找出了土壤群落中的 2 个关键门为 Verrucomicrobia 和 Acidobacteria^[14]。

本研究以中国传统的白酒发酵为研究载体, 试图尝试多种方法以更全面地揭示该发酵系统的核心微生物群(core microbiota)并探究环境因素对其的影响。通过高通量扩增子测序深入挖掘发酵过程中的微生物群落结构, GC-MS 测定样品中的挥发性化合物含量, 并使用多元统计学分析解析发酵过程中微生物群落和代谢轮廓的变化规律, 找出了白酒发酵过程中的核心微生物群, 并量化了环境因素对核心微生物群的影响, 为白酒生产的定向调控提供一定的理论基础。

1 材料和方法

1.1 样品的采集

样品从江苏北部某酒厂采集, 分别从 2 个窖

池发酵的 0、5、8、10、15、20、30、40 d 取样, 共计 16 份。取样时间为 2015 年 4 月。样品采集, 一式 2 份, 立即密封。一份-20 °C 保存用来测定理化指标和物质含量; 一份-80 °C 保存用来提取 DNA。

1.2 理化指标、乙醇、乳酸和挥发性化合物的测定

使用温度计插入窖池 1 m 深处测定酒醅温度。酒醅中的水分采用恒温干燥法测定。酸度采用酸碱中和滴定法。还原糖采用 3,5-二硝基水杨酸(DNS)法测定^[15]。乙醇采用液相色谱仪(Agilent 1200)测定, 色谱柱为 AminexHPX-87H (300 mm×7.8 mm, Bio-Rad), 示差折光检测器(RI)为 Schambeck SFD GmbH, 测定条件参考 Wu 等^[16]的方法。乳酸采用反相高效液相色谱仪(Waters)测定, 色谱柱为 Atlantis T3 C₁₈ 柱(250 mm×4.6 mm), 流动相为 0.5% 的 NaH₂PO₄ (pH 2.7), 测定条件: 进样量 10 μL, 流速 0.25 mL/min, 检测器波长 210 nm, 柱温 40 °C, 保留时间 14 min。挥发性化合物的测定采用气相色谱-质谱联用仪(GC-MS; Agilent 6890N 气相色谱仪和 Agilent 5975 质谱检测器), 色谱柱为 DB-Wax (30 m×0.25 mm×0.25 μm; J&W Scientific), 内标为薄荷醇(106.25 mg/L), 检测条件参考 Kong 等^[17]的报道。

1.3 DNA 的提取、PCR 扩增和 Miseq 测序

称取 7 g 样品, 根据 E.Z.N.A.[®] soil DNA Kit (Omega Bio-Tek, Norcross, GA, USA)的操作说明提取各样品中的 DNA。对于细菌, 针对 16S 的 V3-V4 区进行扩增, 引物为 338F (5'-ACTCCTACG GGAGGCAGCAG-3')和 806R (5'-GACTACHVGG GTWTCTAAT-3')。对于真菌, 扩增区域为 ITS2 区, 引物为 ITS3 (5'-GCATCGATGAAGAACGCAGC-3')和 ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3')。这些引物针对不同的样品都包含有一个 8 核苷酸

barcode 的序列。25 μL 的反应体系包含 2.5 μL 的 10 \times Pyrobest buffer, 2 μL 的 dNTPs (2.5 mmol/L), 正反向引物各 1 μL (10 $\mu\text{mol/L}$), 0.4 μL 的 Pyrobest DNA polymerase (TaKaRa) 和 15 ng 的模板 DNA。细菌的 PCR 扩增程序: 95 $^{\circ}\text{C}$ 预热 5 min; 95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s, 55 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 40 s, 共 25 个循环, 最后 72 $^{\circ}\text{C}$ 保持 10 min; 真菌的 PCR 扩增程序: 95 $^{\circ}\text{C}$ 预热 2 min; 95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s, 61 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 45 s, 共 32 个循环, 最后 72 $^{\circ}\text{C}$ 保持 10 min。PCR 产物根据之前的报道进行纯化^[18]。纯化后的产物经 NanodropND-1000 UV-Vis 定量, 然后将 PCR 产物等分子量混合, 并根据 Low Sample Protocol 进行文库的制备, 最后在 Illumina Miseq (PE300) 平台上机测序。测序后所有的原始序列保存在 DDBJ 数据库, 接受号为 DRA005468 和 DRA005469。

1.4 序列处理

原始序列使用 QIIME pipeline 进行处理^[19]:

(1) 序列归类, 去除标签、引物和接头序列; (2) 去除长度小于 110 bp, 模糊碱基大于 2 和序列平均质量小于 30 分的序列; (3) UCHIME 去除嵌合体。最后使用 UCLUST 把高质量的序列根据 97% 的序列相似度聚成不同的操作性分类单元(OTU), 并计算相应的 Chao1 和 Shannon 指数。

1.5 数据分析

1.5.1 冗余分析(RDA): 为寻找出环境因子和微生物群落或风味轮廓之间的关系, 在 R 语言中使用 Vegan 包分析环境因子对群落结构的影响, 并进行蒙特卡洛置换检验。

1.5.2 Heatmap 绘制和聚类分析: 为找出风味化合物随发酵时间的动态变化规律和样本之间的相似度, 在 R 语言中使用 ComplexHeatmap 包进行数据标准化、样品和变量的聚类以及热图的绘制。

1.5.3 网络绘制: 计算微生物与代谢物之间的 Spearman 相关系数(ρ), 找出 $p > 0.5$ 且 $P < 0.05$ 的连接作为可视化对象。对于微生物之间的共现性(co-occurrence)分析, 首先计算微生物之间的 Spearman 相关系数, 然后选取 $|\rho| > 0.8$ 且 $P < 0.05$ 的作为互作对象。使用 Cytoscape 3.4.0 (<http://www.cytoscape.org>) 对微生物和代谢物以及微生物与微生物之间的相互关系进行可视化, 以表征微生物对代谢物的贡献和微生物与微生物之间的共现性关系。

2 结果和分析

2.1 发酵过程中微生物群落结构组成及其动态变化

通过 Illumina Miseq 测序来确定发酵过程中的微生物群落组成。对于细菌, 质控后共得到 450273 条高质量的序列, 平均每个样本具有 28142 ± 5001 条; 并得到 3824 个 OTUs, 每个样品共得到 239 ± 95 个 OTUs。对于真菌, 质控后共得到 450273 条高质量的序列, 平均每个样本具有 89898 ± 39131 条; 并得到 1799 个 OTUs, 每个样品共得到 112 ± 15 个 OTUs。每个样品的覆盖率均在 99% 以上, 表明足够的测序深度和可靠的数据质量^[20]。具体的测序信息如 Chao1 和 Shannon 指数等见表 1。

通过统计发现, 在真菌群落中, 0–8 d 主要由 3 个真菌目主导, 包括 Saccharomycetales、Eurotiales 和 Mucorales; 8 d 之后, 则由 Saccharomycetales 和 Trichosporonales 替代(图 1-A)。对于细菌, 在最初的 10 d 内, Lactobacillales 和 Bacillales 占优; 之后 Lactobacillales 迅速增长并占据绝对优势。总体来讲, Saccharomycetales (51.12%–95.21%) 和 Lactobacillales (39.39%–94.65%) 在整个发酵过程中具有很高的优势性。在属水平共得到 69 个真菌属和 215 个细菌属。在这些属中, *Pichia* (11.27%–49.51%)、

表 1. Illumina 测序的统计信息

Table 1. Sample statistical information about Illumina sequencing results

| Sample ID | 16S | | | | | ITS | | | | |
|-----------|-------|------|-------------------|-------|---------|--------|--------|-------------------|-------|---------|
| | Reads | OTUs | Good's coverage/% | Chao1 | Shannon | Reads | OTUs | Good's coverage/% | Chao1 | Shannon |
| GN0_1 | 29562 | 199 | 99.86 | 227 | 3.01 | 91193 | 90852 | 99.95 | 125 | 3.32 |
| GN0_2 | 20254 | 149 | 99.79 | 214 | 2.39 | 93725 | 93287 | 99.95 | 129 | 3.57 |
| GN5_1 | 31869 | 382 | 99.73 | 450 | 3.08 | 84125 | 83952 | 99.96 | 124 | 3.73 |
| GN5_2 | 33317 | 306 | 99.74 | 376 | 2.86 | 51580 | 51443 | 99.97 | 104 | 3.11 |
| GN8_1 | 27029 | 238 | 99.76 | 315 | 2.51 | 146085 | 145843 | 99.95 | 125 | 3.15 |
| GN8_2 | 31969 | 376 | 99.73 | 451 | 3.03 | 65313 | 65071 | 99.94 | 143 | 3.63 |
| GN10_1 | 20693 | 315 | 99.47 | 474 | 2.79 | 199146 | 198786 | 99.94 | 134 | 2.34 |
| GN10_2 | 27161 | 383 | 99.78 | 425 | 3.59 | 99743 | 99414 | 99.95 | 128 | 3.32 |
| GN15_1 | 27722 | 221 | 99.69 | 329 | 1.17 | 59279 | 59111 | 99.95 | 121 | 3.07 |
| GN15_2 | 33162 | 167 | 99.78 | 278 | 1.01 | 54972 | 54790 | 99.95 | 116 | 3.00 |
| GN20_1 | 27095 | 292 | 99.63 | 376 | 1.23 | 64047 | 63805 | 99.96 | 109 | 3.45 |
| GN20_2 | 34782 | 115 | 99.89 | 161 | 1.26 | 129654 | 129513 | 99.95 | 102 | 2.43 |
| GN30_1 | 34850 | 233 | 99.70 | 357 | 0.83 | 53366 | 53158 | 99.97 | 105 | 3.12 |
| GN30_2 | 19903 | 199 | 99.56 | 297 | 1.35 | 91661 | 91576 | 99.96 | 91 | 1.78 |
| GN40_1 | 25459 | 174 | 99.65 | 325 | 0.89 | 123240 | 122946 | 99.93 | 136 | 2.15 |
| GN40_2 | 25446 | 75 | 99.88 | 117 | 1.08 | 116432 | 116129 | 99.97 | 106 | 3.28 |

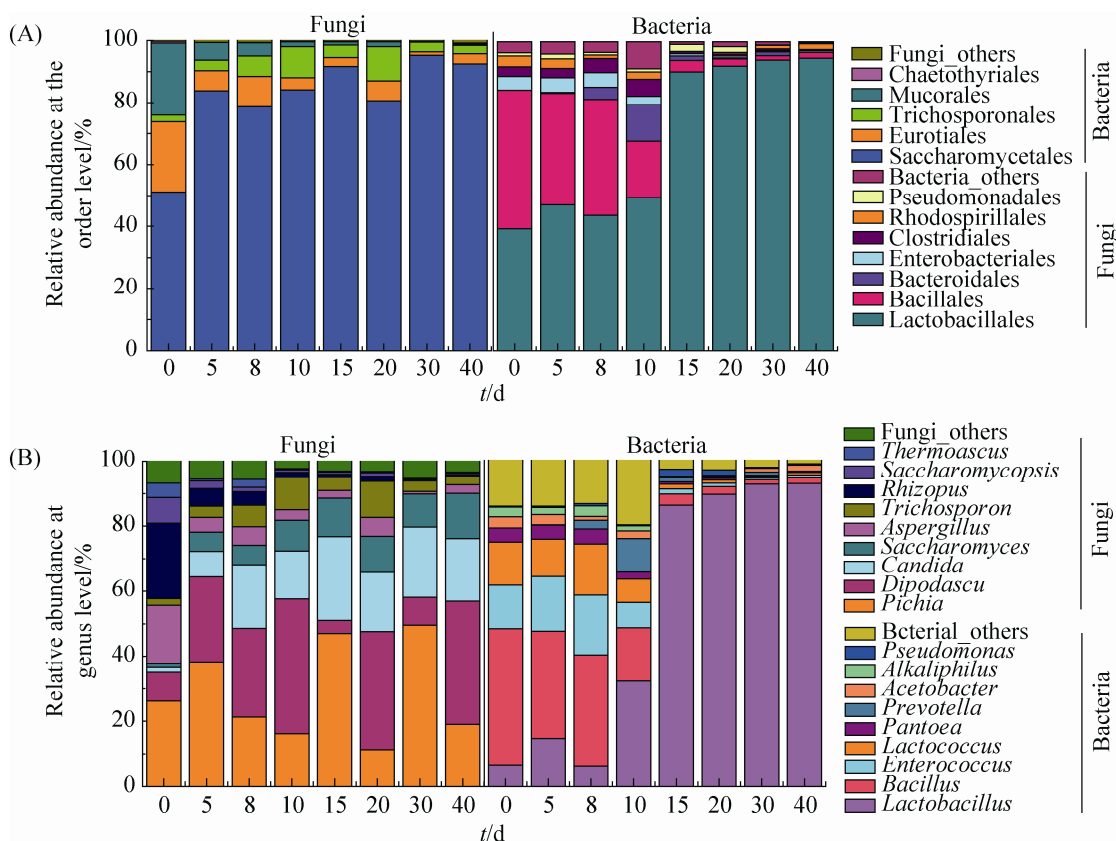


图 1. 发酵过程中微生物群落结构在目水平(A)和属水平(B)的分布变化

Figure 1. Distribution of microbial community at the order level (A) and at the genus level (B) in fermented grains during the fermentation process.

Dipodascus (4.03%–41.38%)、*Candida* (1.48%–25.88%)、*Saccharomyces* (1.19%–13.48%) 和 *Aspergillus* (1.19%–13.84%) 在整个发酵过程中具有一定的优势。*Bacillus*、*Enterococcus* 和 *Lactococcus* 在 0–10 d 占优, 10 d 后 *Lactobacillus* 迅速从 6.03%

增长到 92.80% (图 1-B)。

2.2 发酵过程中代谢物的变化

在发酵过程中, 共鉴定出 61 种代谢物, 包括 5 种醇类、10 种酸类、25 种酯类、17 种芳香族化合物和 4 种杂环类化合物(图 2)。基于这些化合物

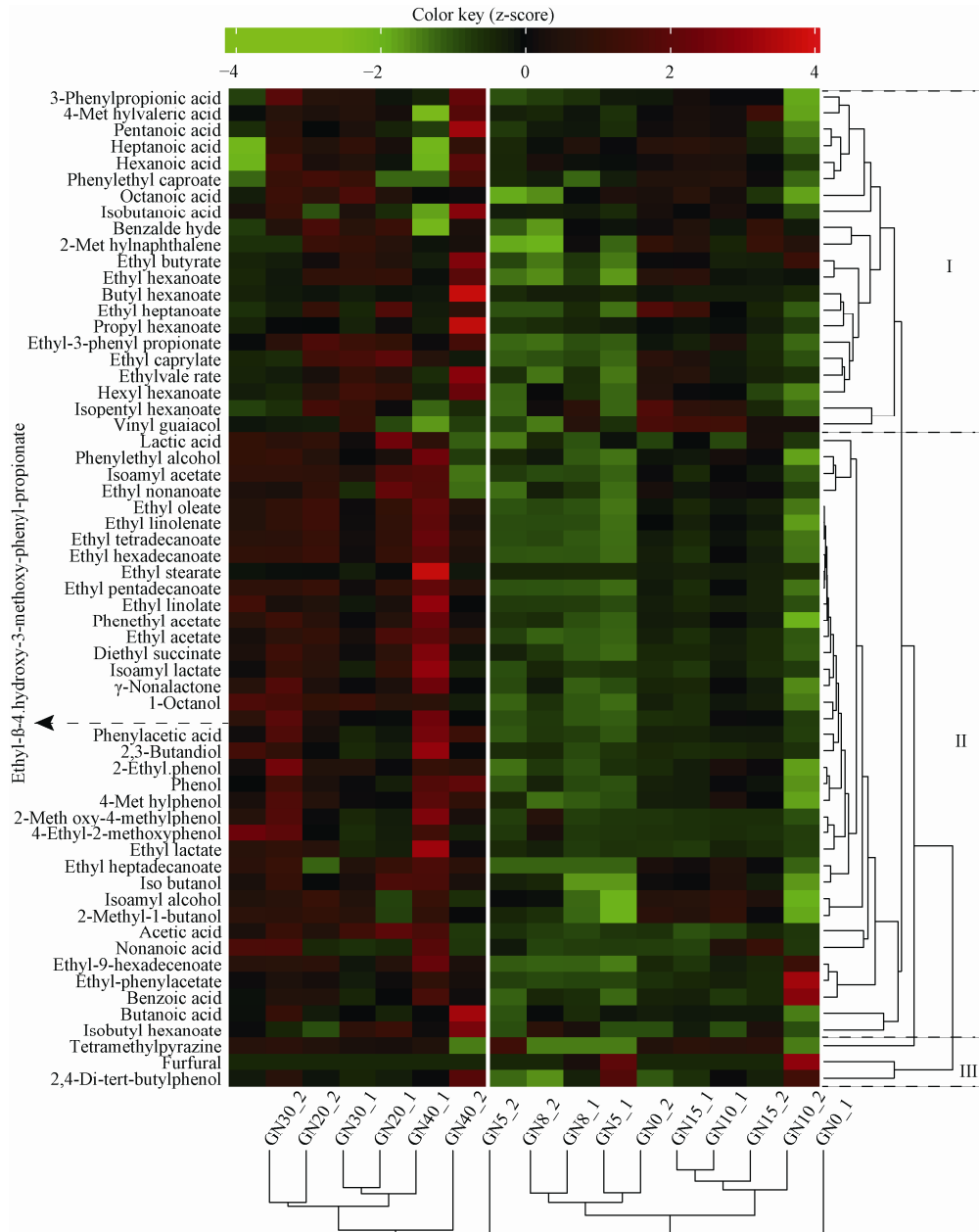


图 2. 酒醅发酵过程中风味化合物的变化热图

Figure 2. Heatmap of change in metabolic profiling during the fermentation process. Clustering analysis was performed using Pearson correlation and Euclidean distance based on the relative content of metabolites during the fermentation process. Data were processed by z-score transformation.

相对含量的聚类分析表明, 样本被分成了 2 个发酵阶段(阶段 I: 0–20 d; 阶段 II: 20–40 d)。代谢物则可以分成 3 组: 组 I 包含 21 种化合物(9 种酯类, 6 种酸类, 5 种芳香类和 1 种杂环类); 组 II 包含 37 种物质(4 种酸类, 11 种芳香类, 16 种酯类, 5 种醇类, 1 种杂环类); 组 III 则包含有 3 种物质, 分别是 2,4-二叔丁基苯酚、糠醛和四甲基吡嗪。组 I 的化合物在前期(10–15 d)和后期(20–40 d)均有产生; 组 II 中的化合物几乎在后期才产生; 组 III 在发酵初始(0 d 和 5 d)和发酵后期(20 d 之后)的含量相对较高。这表明 20 d 之后的发酵期是白酒发酵过程中的风味物质高产期。

2.3 揭示酿造核心微生物群

我们选取丰度在前 20 的细菌属和前 20 的真菌属, 计算这 40 个属与 61 种代谢物之间的

Spearman 相关系数(p), 选取 $p>0.5$ 且 $P<0.05$ 作为有效的网络连接并绘图如图 3。可以发现, *Lactobacillus* 和 *Saccharomyces* 是连接数最大的 2 个属(36 和 22), 相关的化合物主要是酯类、酸类、醇类和芳香族化合物, 尤其是这 2 个属都贡献重要物质乙酸(VC10)和乙醇(E), 且 *Lactobacillus* 与乳酸(VC61)也有显著的正相关。*Candida* 与辛酸乙酯(VC44), 乙酸异戊酯(VC3), 2-甲基-1-丁醇(VC1)、苯乙醇(VC54)、异戊醇(VC2)和乙醇(E)都有一定的正相关性。还原糖(S)和糠醛(VC24)则与多个属具有正向的联系。其次是 *Dekkera*、*Pseudeurotium*、*Trichosporon* 与一些酯类、芳香类和杂环类化合物具有显著的相关性。以上结果表明在白酒酒醅发酵过程中, 比较重要的代谢产物贡献者是 *Lactobacillus*、*Saccharomyces* 和 *Candida*。具体的网络图信息见表 1。

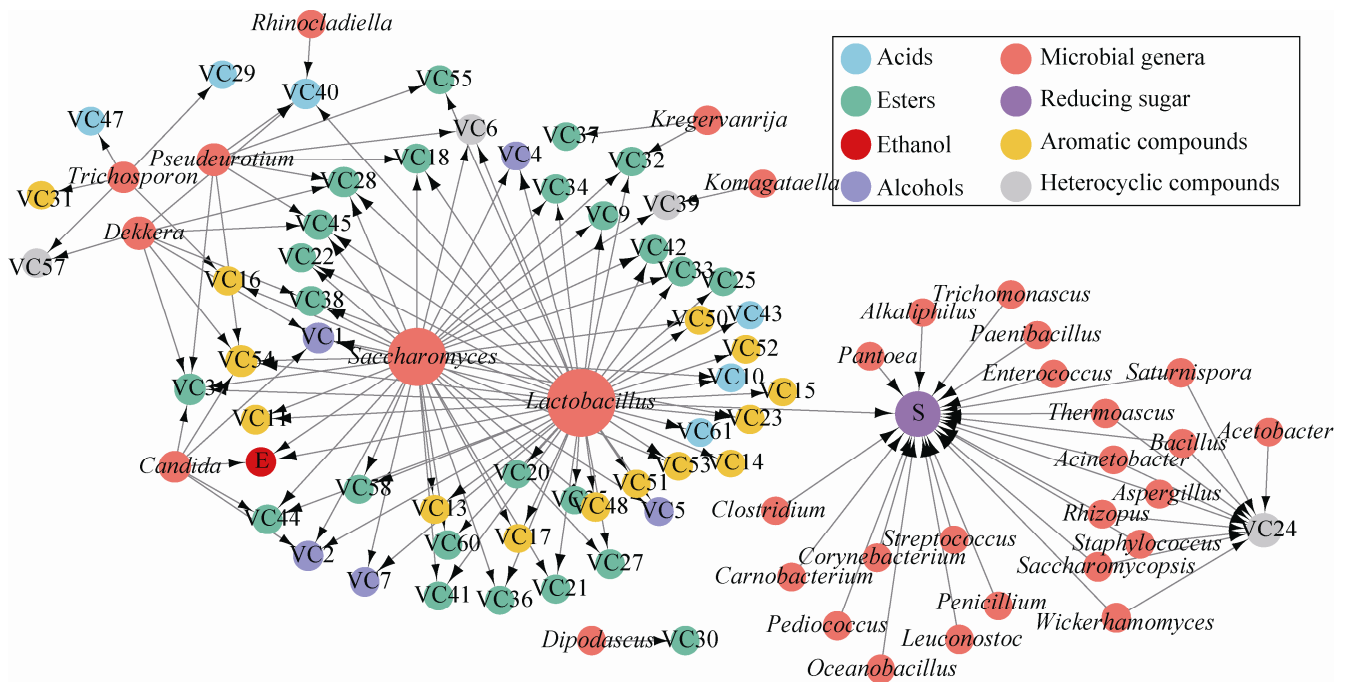


图 3. 微生物和风味化合物的相关性网络图

Figure 3. Correlation network between microbial genera (pink) and compounds (other colored circles indicate different groups of compounds) calculated by statistically significant ($P<0.05$) Spearman correlation coefficient ($p>0.5$). The size of nodes indicates the degree of connections. Edge thickness represents the proportional to the value of Spearman's correlation.

为探究微生物之间的相互作用关系，通过共现性网络分析(co-occurrence network analysis)，共得到 38 个有效的连接节点(nodes)和 267 个边(edges)。网络的聚类系数为 0.622，较强的连接节点(每个节点有超过 12 条边的连接)大多分布在 Lactobacillales、Enterobacteriales 和 Bacillales，包括 *Lactobacillus*、*Bacillus*、*Enterococcus*、*Lactococcus*、*Pantoea*、*Rhizopus*、*Carnobacterium*、*Acinetobacter*、*Leuconostoc*、*Oceanobacillus*、*Paenibacillus*、*Saccharomycopsis*、*Staphylococcus*、*Streptococcus*、*Alkaliphilus*、*Thermoascus*、*Clostridium*、*Wickerhamomyces*、*Penicillium*、*Corynebacterium* 和 *Trichomonascus*，各菌属的共现率(incidence of co-occurrence)在 2% 以上(图 4)，尤其是 *Lactobacillus* 与其他 15 个属具有显著的负相关性。此外，*Lactobacillus*、*Rhizopus*、*Bacillus*、*Lactococcus*、*Saccharomycopsis*、*Alkaliphilus*、*Thermoascus*、*Enterococcus* 和

Pantoea 的平均相对丰度在 1% 以上，且共现率均在 3.5% 以上。*Pichia* 和 *Dipodascus* 的平均相对丰度尤其较高，分别为 28.91% 和 25.95% (表 2)。*Alkaliphilus*、*Enterococcus* 和 *Pantoea* 被认为是来自于动物肠道、植物根部或土壤且对食品发酵具有污染性的菌属^[21-23]。

根据风味贡献程度，相互作用关系强度和相对丰度(图 3，图 4，表 2)，得到发酵过程中的核心微生物群共包含 10 个属：*Lactobacillus*、*Saccharomyces*、*Candida*、*Rhizopus*、*Saccharomycopsis*、*Pichia*、*Dipodascus*、*Bacillus*、*Thermoascus* 和 *Lactococcus*。为验证所鉴定的核心微生物群是否推动了风味的演变，通过提取二者的第一主成分并进行相关性分析后发现，核心微生物群与风味轮廓的演变具有极显著的相关性(图 5， $r^2=0.627$ ， $P<0.001$)，说明这 10 个属所组成的核心微生物群是白酒发酵过程中风味演替的主要推动者。

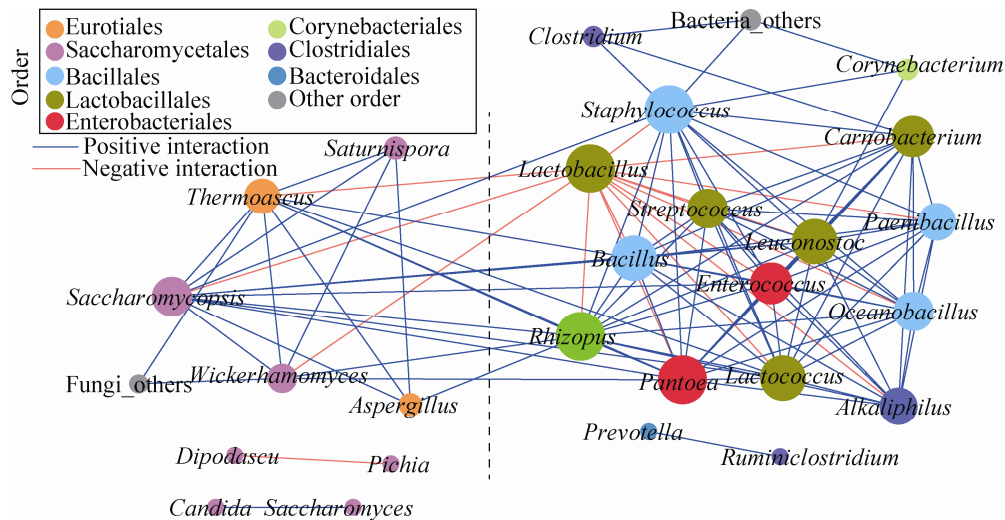


图 4. 酒醅中微生物之间的共现性网络图

Figure 4. Correlation network of co-occurring microbial genera in fermented grains. Statistically significant ($P<0.05$) Spearman correlation coefficient ($|\rho|>0.8$) indicates the robust correlations. The size of nodes indicates the degree of connections. The same color of nodes indicates the same order. Edge thickness represents the proportional to the value of Spearman's correlation. Blue and red edge indicate positive and negative interaction between nodes.

表 2. 核心微生物属的相对丰度信息和网络中的共现率

Table 2. The information about the relative abundance of genus in the microbial group during the fermentation process.

| Genus | Average abundance/% | Highest abundance/% | Lowest abundance/% | Incidence of co-occurrence/% |
|-------------------------|---------------------|---------------------|--------------------|------------------------------|
| <i>Lactobacillus</i> | 52.53 | 93.27 | 3.15 | 4.68 |
| <i>Bacillus</i> | 16.78 | 47.23 | 0.88 | 4.49 |
| <i>Enterococcus</i> | 7.55 | 20.19 | 0.39 | 4.49 |
| <i>Lactococcus</i> | 6.43 | 16.48 | 0.20 | 4.49 |
| <i>Rhizopus</i> | 4.71 | 24.83 | 0.03 | 4.49 |
| <i>Pantoea</i> | 2.15 | 4.97 | 0.16 | 4.49 |
| <i>Saccharomycopsis</i> | 1.86 | 10.80 | 0.08 | 4.12 |
| <i>Alkaliphilus</i> | 1.35 | 3.77 | 0.07 | 3.75 |
| <i>Thermoascus</i> | 1.14 | 5.57 | 0.04 | 3.75 |
| <i>Saccharomyces</i> | 9.73 | 13.84 | 5.87 | 1.31 |
| <i>Candida</i> | 18.19 | 25.88 | 7.92 | 0.75 |
| <i>Dipodascus</i> | 25.95 | 41.38 | 4.03 | 0.19 |
| <i>Pichia</i> | 28.91 | 49.51 | 11.27 | 0.19 |

Incidence of co-occurrence is the ratio of targeted edges to total edges.

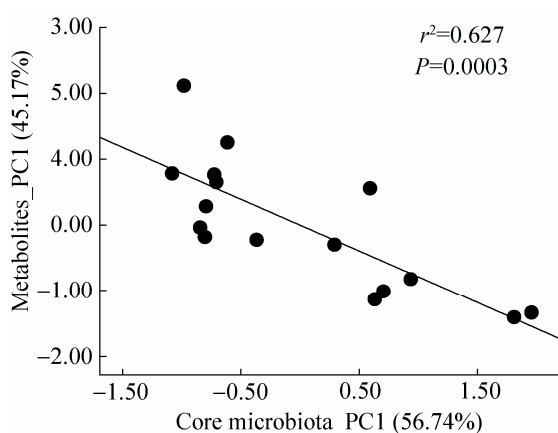


图 5. 微生物群落结构和风味结构的相关性

Figure 5. Correlations between core microbiota PC1 (56.74%) and metabolic PC1 (45.17%).

2.4 环境因素对核心微生物群的影响

为揭示由 10 个属组成的核心微生物群和环境因子之间的关系,使用冗余分析进行定量化分析并进行蒙特卡洛置换检验。首先将环境因子分为两类:物理因素包括水分、酸度和温度,化学因素包括还原糖、乙醇、乳酸和乙酸(表 2)。冗余分

析表明 7 个因素能够解释绝大部分的核心微生物群的动态变化(74.38%),说明环境因素的确是驱动群落演变的主要因素(图 6)。蒙特卡洛置换检验的结果表明,对核心微生物群的演替具有重要影响的因素共有 5 个:水分、酸度、温度、还原糖和乙醇,因为这 5 个因素与该微生物群的分布具有显著的相关性($r^2 > 0.5$, $P < 0.01$) (表 3)。化学因素对群落变化的解释性(21.46%)要高于物理因素(3.37%) (图 6),表明核心微生物群的演变主要是由微生物产生的代谢物引起的化学因素所驱动的。此外,物理因素和化学因素的互作对其演变也具有非常重要的影响(49.55%)。如表 4 所示,还原糖几乎与除 *Lactobacillus* 和 *Saccharomyces* 外的所有菌属具有显著的正相关;其他 6 个环境因素则与 *Lactobacillus*、*Candida* 和 *Saccharomyces* 具有一定的正相关性,而与 *Bacillus*、*Lactococcus*、*Rhizopus*、*Thermoascus* 和 *Saccharomycopsis* 具有一定的负相关性。

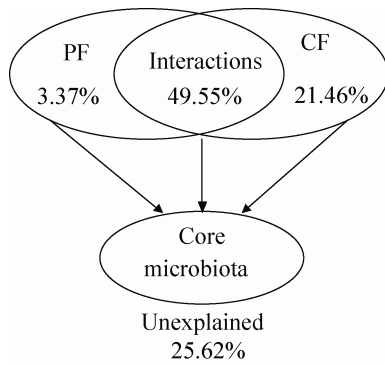


图 6. 环境因素对核心微生物群的影响及其解释性

Figure 6. Variation partitioning of the core microbiota among physical factors (PF: moisture, acidity and temperature), chemical factors (CF: reducing sugar, ethanol, lactic acid and acetic acid) and their interactions.

表 3. 核心微生物群与环境因子之间的蒙特卡洛置换检验结果

Table 3. Monte Carlo permutation test of the core microbiota with environmental factors.

| Monte Carlo permutation test | r^2 | P |
|------------------------------|-----------|-------|
| Moisture/% | 0.7172** | 0.003 |
| Acidity/(g/100g) | 0.5273** | 0.009 |
| Temperature/°C | 0.7016*** | 0.001 |
| Reducing sugar/(mg/g) | 0.6770*** | 0.001 |
| Ethanol/(mg/g) | 0.9042*** | 0.001 |
| Lactic acid/(mg/g) | 0.2435 | 0.164 |
| Acetic acid/(mg/g) | 0.3558 | 0.069 |

表 4. 各环境因素与核心微生物属的 Spearman 相关性

Table 4. Spearman correlation between each genus in the core microbiota and environmental factors during fermentation process

| Genus | Moisture/% | Acidity/(g/100g) | $T/^\circ\text{C}$ | Reducing sugar/(mg/g) | Ethanol/(mg/g) | Lactic acid/(mg/g) | Acetic acid/(mg/g) |
|-------------------------|------------|------------------|--------------------|-----------------------|----------------|--------------------|--------------------|
| <i>Lactobacillus</i> | 0.696** | 0.644** | 0.736** | -0.929** | 0.909** | 0.732** | 0.615* |
| <i>Bacillus</i> | -0.726** | -0.515* | -0.809** | 0.856** | -0.906** | -0.718** | -0.662** |
| <i>Lactococcus</i> | -0.692** | -0.391 | -0.757** | 0.885** | -0.847** | -0.679** | -0.609* |
| <i>Pichia</i> | -0.090 | -0.035 | -0.149 | 0.106 | -0.285 | -0.341 | -0.409 |
| <i>Dipodascus</i> | 0.147 | 0.179 | 0.035 | 0.006 | 0.147 | 0.232 | 0.176 |
| <i>Candida</i> | 0.405 | 0.571* | 0.493 | -0.353 | 0.594* | 0.162 | 0.412 |
| <i>Saccharomyces</i> | 0.642** | 0.479 | 0.557* | -0.512* | 0.603* | 0.300 | 0.550* |
| <i>Rhizopus</i> | -0.712** | -0.635** | -0.758** | 0.879** | -0.912* | -0.721** | -0.550* |
| <i>Saccharomycopsis</i> | -0.690** | -0.521* | -0.672** | 0.803** | -0.812** | -0.609* | -0.482 |
| <i>Thermoascus</i> | -0.655** | -0.600* | -0.784** | 0.782** | -0.835** | -0.597* | -0.350 |

Red and green indicate positive and negative correlation with each environmental factors. The bold indicates significant differences. **, $P < 0.01$; *, $P < 0.05$.

3 讨论

近年来, 有关发酵食品的研究越来越多地集中在微生物群落结构的挖掘上。据报道, 许多分子手段尤其是二代测序技术已经广泛应用到食品发酵的研究当中, 为我们了解食品发酵的本质提供了更广阔的视角^[24]。由于大曲和新粮的加入以及酒醅暴露在空气中, 在白酒的固态发酵前期, 在酒醅入窖池时, 会有多种微生物混入其中, 从

而导致前期的微生物群落结构比较离散。随着发酵的进行, 由于温度、酸度和乙醇的升高以及可利用还原糖的下降, 窖池内的生态环境逐渐变成一个相对极端的环境, 导致后期发酵微生物群落尤其是细菌群落的相对集中。

不同的发酵食品由不同的核心微生物组成, 如 *Acetobactor* 和 *Lactobacillus* 对于醋的发酵^[25], *Lactobacillus* 和 *Streptococcus* 对于奶酪的发酵^[26]。核心微生物群对于保证发酵食品的风味多样性和

产品质量的批次稳定性具有重要的作用^[27]。本研究从白酒发酵过程中共揭示出 10 个核心微生物属。*Saccharomyces* 是白酒酿造过程中的优势酵母属之一^[16], 且能够产生多种风味酯并贡献乙醇和其他有机酸^[28]。*Lactobacillus* 是该过程的优势细菌属, 如 *Lactobacillus rhamnosu*、*Lactobacillus fermentum*、*Lactobacillus acetotolerans*、*Lactobacillus kefir* 等乳酸菌在不同的发酵食品中能够贡献乙醇、乙酸、乳酸和其他的重要风味物质^[29-31], 由于这些物质(乙醇、乙酸和乳酸等)能够较快地改变发酵过程中的生态环境, 使得其他不耐受微生物的生长受到抑制, 这也是 *Lacobacillus* 与很多其他菌属具有负相关, 并且使得化学因素成为驱动菌群变化的重要原因。有报道指出, *Lactococcus* 具有一定的氨肽酶活性和蛋白质水解力, 并且有一定的风味贡献功能^[32]。*Bacillus*、*Candida*、*Pichia*、*Saccharomycopsis* 以及 *Rhizopus* 是大曲成熟过程中的优势菌属之一^[33], 前三者在白酒酿造中具有潜在的风味贡献功能^[34-35], 如 *Bacillus* 能够产生多种酚类和含氮类杂环化合物。*Saccharomycopsis* 和 *Rhizopus* 则具有较高的淀粉酶和糖苷酶活性^[36], *Thermoascus* 能够产生热稳定的水解酶如纤维素酶和木聚糖酶^[37], 这些菌属在白酒酿造过程中能够降解谷物中的淀粉或纤维素, 是白酒发酵不可或缺的重要菌属。而目前关于 *Dipodascus* 在发酵食品中的报道较少, 但在本研究中由于所检测到的比例较高, 所以也将其列为核心微生物属之一。以上 10 个属所组成的核心微生物群与风味的演变具有显著的相关性, 说明这 10 个属组成的核心微生物群是白酒发酵过程中的关键微生物群。

本研究从微生物组和代谢组的角度, 结合多元统计学分析更加全面地揭示了白酒发酵过程中的核心微生物群, 并量化了各环境因素对核心微

生物群的影响, 为下一步白酒酿造的定向调控提供参考。

参 考 文 献

- [1] Giraffa G. Studying the dynamics of microbial populations during food fermentation. *FEMS Microbiology Reviews*, 2004, 28(2): 251-260.
- [2] Smid EJ, Lacroix C. Microbe-microbe interactions in mixed culture food fermentations. *Current Opinion in Biotechnology*, 2013, 24(2): 148-154.
- [3] Großkopf T, Soyer OS. Synthetic microbial communities. *Current Opinion in Microbiology*, 2014, 18: 72-77.
- [4] Wolfe BE, Dutton RJ. Fermented foods as experimentally tractable microbial ecosystems. *Cell*, 2015, 161(1): 49-55.
- [5] De Roy K, Marzorati M, van den Abbeele P, van de Wiele T, Boon N. Synthetic microbial ecosystems: an exciting tool to understand and apply microbial communities. *Environmental Microbiology*, 2014, 16(6): 1472-1481.
- [6] Wolfe BE, Button JE, Santarelli M, Dutton RJ. Cheese rind communities provide tractable systems for *in situ* and *in vitro* studies of microbial diversity. *Cell*, 2014, 158(2): 422-433.
- [7] de Pasquale I, di Cagno R, Buchin S, de Angelis M, Gobbetti M. Microbial ecology dynamics reveal a succession in the core microbiota involved in the ripening of pasta filata caciocavallo pugliese cheese. *Applied and Environmental Microbiology*, 2014, 80(19): 6243-6255.
- [8] 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: 26818.
- [9] 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.
- [10] Rui JP, Li JB, Zhang SH, Yan XF, Wang YP, Li XZ. The core populations and co-occurrence patterns of prokaryotic communities in household biogas digesters. *Biotechnology for Biofuels*, 2015, 8: 158.
- [11] Chaillou S, Chaulot-Talmon A, Caekebeke H, Cardinal M, Christieans S, Denis C, Desmonts MH, Dousset X, Feurer C, Hamon E, Joffraud JJ, La Carbona S, Leroi F, Leroy S, Lorre S, Macé S, Pilet MF, Prévost H, Rivollier M, Roux D, Talon R, Zagorec M, Champomier-Vergès MC. Origin and ecological selection of core and food-specific bacterial communities associated with meat and seafood spoilage. *The ISME Journal*, 2015, 9(5): 1105-1118.

- [12] Cardinale M, Grube M, Erlacher A, Quehenberger J, Berg G. Bacterial networks and co-occurrence relationships in the lettuce root microbiota. *Environmental Microbiology*, 2015, 17(1): 239–252.
- [13] Parente E, Coccolin L, de Filippis F, Zotta T, Ferrocino I, O’Sullivan O, Neviani E, de Angelis M, Cotter PD, Ercolini D. Food Microbionet: A database for the visualisation and exploration of food bacterial communities based on network analysis. *International Journal of Food Microbiology*, 2016, 219: 28–37.
- [14] Barberán A, Bates ST, Casamayor EO, Fierer N. Using network analysis to explore co-occurrence patterns in soil microbial communities. *The ISME Journal*, 2012, 6(2): 343–351.
- [15] Wang Y, Yuan B, Ji YC, Li H. Hydrolysis of hemicellulose to produce fermentable monosaccharides by plasma acid. *Carbohydrate Polymers*, 2013, 97(2): 518–522.
- [16] Wu Q, Chen LQ, Xu Y. Yeast community associated with the solid state fermentation of traditional Chinese *Maotai*-flavor liquor. *International Journal of Food Microbiology*, 2013, 166(2): 323–330.
- [17] 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): 3667–3376.
- [18] Ren GD, Ren WJ, Teng Y, Li ZG. Evident bacterial community changes but only slight degradation when polluted with pyrene in a red soil. *Frontiers in Microbiology*, 2015, 6: 22.
- [19] Caporaso JG, Kuczynski J, Stombaugh J, Bittinger K, Bushman FD, Costello EK, Fierer N, Peña AG, Goodrich JK, Gordon JI, Huttley GA, Kelley ST, Knights D, Koenig JE, Ley RE, Lozupone CA, McDonald D, Muegge BD, Pirrung M, Reeder J, Sevinsky JR, Turnbaugh PJ, Walters WA, Widmann J, Yatsunenko T, Zaneveld J, Knight R. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nature Methods*, 2010, 7(5): 335–336.
- [20] Lemos LN, Fulthorpe RR, Triplett EW, Roesch LFW. Rethinking microbial diversity analysis in the high throughput sequencing era. *Journal of Microbiological Methods*, 2011, 86(1): 42–51.
- [21] Gobetti M, Minervini F, Pontonio E, di Cagno R, de Angelis M. Drivers for the establishment and composition of the sourdough lactic acid bacteria biota. *International Journal of Food Microbiology*, 2016, 239: 3–18.
- [22] Ambardar S, Sangwan N, Manjula A, Rajendhran J, Gunasekaran P, Lal R, Vakhlu J. Identification of bacteria associated with underground parts of *Crocus sativus* by 16S rRNA gene targeted metagenomic approach. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 2014, 30(10): 2701–2709.
- [23] Cai L, Yu K, Yang Y, Chen BW, Li XD, Zhang T. Metagenomic exploration reveals high levels of microbial arsenic metabolism genes in activated sludge and coastal sediments. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2013, 97(21): 9579–9588.
- [24] Kergourlay G, Taminiau B, Daube G, Vergès MCC. Metagenomic insights into the dynamics of microbial communities in food. *International Journal of Food Microbiology*, 2015, 213: 31–39.
- [25] Li S, Li P, Liu X, Luo LX, Lin WF. Bacterial dynamics and metabolite changes in solid-state acetic acid fermentation of Shanxi aged vinegar. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2016, 100(10): 4395–4411.
- [26] Monnet C, Dugat-Bony E, Swennen D, Beckerich JM, Irlinger F, Fraud S, Bonnarme P. Investigation of the activity of the microorganisms in a reblochon-style cheese by metatranscriptomic analysis. *Frontiers in Microbiology*, 2016, 7: 536.
- [27] Awasthi A, Singh M, Soni SK, Singh R, Kalra A. Biodiversity acts as insurance of productivity of bacterial communities under abiotic perturbations. *The ISME Journal*, 2014, 8(12): 2445–2452.
- [28] Wu Q, Xu Y, Chen LQ. Diversity of yeast species during fermentative process contributing to Chinese *Maotai*-flavour liquor making. *Letters in Applied Microbiology*, 2012, 55(4): 301–307.
- [29] Laakso K, Koskenniemi K, Koponen J, Kankainen M, Surakka A, Salusjärvi 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] Annan NT, Poll L, Sefa-Dedeh S, Plahar WA, Jakobsen M. Volatile compounds produced by *Lactobacillus fermentum*, *Saccharomyces cerevisiae* and *Candida krusei* in single starter culture fermentations of Ghanaian maize dough. *Journal of Applied Microbiology*, 2003, 94(3): 462–474.
- [31] de Angelis M, Calasso M, Cavallo N, di Cagno R, Gobetti M. Functional proteomics within the genus *Lactobacillus*. *Proteomics*, 2016, 16(6): 946–962.
- [32] Centeno JA, Tomillo FJ, Fernández-García E, Gaya P, Nuñez M. Effect of wild strains of *Lactococcus lactis* on the volatile profile and the sensory characteristics of ewes’ raw milk cheese. *Journal of Dairy Science*, 2002, 85(12): 3164–3172.
- [33] Liu X, Guo KL, Zhang HX. Determination of microbial diversity in Daqu, a fermentation starter culture of *Maotai*

- liquor, using nested PCR-denaturing gradient gel electrophoresis. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 2012, 28(6): 2375–2381.
- [34] Rojas V, Gil JV, Piñaga F, Manzanares P. Studies on acetate ester production by non-*Saccharomyces* wine yeasts. *International Journal of Food Microbiology*, 2001, 70(3): 283–289.
- [35] Meng X, Wu Q, Wang L, Wang DQ, Chen LQ, Xu Y. Improving flavor metabolism of *Saccharomyces cerevisiae* by mixed culture with *Bacillus licheniformis* for Chinese Maotai-flavor liquor making. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 2015, 42(12): 1601–1608.
- [36] Zheng XW. Daqu-a traditional fermentation starter in China: microbial ecology and functionality. Doctor Dissertation of Wageningen University, 2015.
- [37] Jain KK, Dey TB, Kumar S, Kuhad RC. Production of thermostable hydrolases (cellulases and xylanase) from *Thermoascus aurantiacus* RCKK: a potential fungus. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 2015, 38(4): 787–796.

Core microbiota in Chinese liquor fermentation and associations with environmental factors

Peng Wang, Qun Wu*, Yan Xu

Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, School of Biotechnology, Jiangnan University, Center for Brewing Science and Enzyme Technology, Wuxi 214122, Jiangsu Province, China

Abstract: [Objective] The aim of this study is to reveal core microbiota during Chinese liquors fermentation, and to quantify the impact of environmental factors on the variations of the core microbiota. [Methods] The microbial community composition was characterized by high-throughput sequencing. The volatile compounds were analyzed by gas chromatography-mass spectrometry. Core microbiota was defined according to the microbial function and microbial correlation patterns using the microbe-metabolite correlation approach and co-occurrence network analysis. We used redundancy analysis and Monte Carlo permutation test to analyze the influence of environmental factors on the core microbiota. [Results] The core microbiota during the liquor fermentation consisted of *Lactobacillus*, *Saccharomyces*, *Candida*, *Rhizopus*, *Saccharomycopsis*, *Pichia*, *Dipodascus*, *Bacillus*, *Thermoascus* and *Lactococcus*. The variations of the core microbiota were mainly affected by the chemical factors such as reducing sugar and ethanol. In addition, the interaction between physical and chemical factors was also substantial for the core microbiota variations. [Conclusion] This study disentangled the relationship between microbial communities and metabolites, found out the core microbiota in the liquor fermentation process, and quantified the influence of environmental factors on the variations of core microbiota, hence providing a theoretical perspective for regulating the production of liquors by using synthetic microbial communities or by controlling environmental factors.

Keywords: Chinese liquors, high-throughput sequencing, core microbiota, environmental factors

(本文责编: 张晓丽)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (31530055) and by the National Key Research and Development Program (2016YFD0400503)

*Corresponding author. Tel/Fax: +86-510-85864112; E-mail: wuq@jiangnan.edu.cn

Received: 14 February 2017; Revised: 17 March 2017; Published online: 6 April 2017