



泸型酒酒醅细菌群落的发酵演替规律

肖辰^{1,2}, 陆震鸣^{2,4}, 张晓娟^{2,4}, 王松涛⁵, 李德林⁵, 沈才洪⁵, 史劲松³,
许正宏^{1,2,4,5*}

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

² 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

³ 江南大学药学院, 江苏 无锡 214122

⁴ 江苏省生物活性制品加工工程技术研究中心, 江苏 无锡 214122

⁵ 国家固态酿造工程技术研究中心, 四川 泸州 646000

摘要:【目的】考察泸型酒发酵过程中酒醅细菌群落的演替规律, 探讨菌群演替与环境因素变化的相关性。【方法】采用高通量测序技术分析泸型酒酒醅细菌群落的演替规律, 并运用 Mantel test 分析不同发酵阶段的细菌群落演替与环境因素变化的相关性。【结果】酒醅发酵过程中有 397 个属的微生物, 其中 *Lactobacillus*、*Bacillus*、*Weissella*、*Dysgonomonas*、*Comamonas* 以及 *Ruminococcaceae* 为优势属(相对丰度>1.0%)。通过聚类分析可将酒醅发酵过程划分为 3 个阶段: 阶段 I (0–5 d), 阶段 II (6–17 d) 和阶段 III (18–40 d), 且 3 个阶段的酒醅菌群结构差异显著($P<0.05$)。Metastats 分析结果表明, 与阶段 I 相比, 阶段 II 酒醅细菌群落中 *Lactobacillus* 和 unclassified Lactobacillaceae 相对丰度显著升高($P<0.05$), 而 unclassified Bacillaceae、*Staphylococcus*、*Bacillus*、unclassified Enterobacteriaceae、*Lactococcus*、*Pseudomonas*、*Thermoactinomyces*、*Leuconostoc*、*Staphylococcus* 相对丰度显著降低($P<0.05$)。与阶段 II 相比, 阶段 III 酒醅细菌群落中 *Lactobacillus* 相对丰度显著增长($P<0.05$), *Comamonas*、*Acetobacter*、unclassified Bacilli、*Clostridium*、*Bacillus*、*Ruminococcus*、unclassified Porphyromonadaceae 和 unclassified Streptophyta 相对丰度显著下降($P<0.05$)。结果表明, 阶段 I 的细菌菌群演替与酒醅温度、水分和乙醇浓度变化线性相关($P<0.05$); 阶段 II 和阶段 III 的细菌菌群演替与酒醅温度、水分、酸度、乙醇浓度均没有相关性($P>0.05$)。【结论】泸型酒酒醅中细菌群落不同发酵阶段结构差异显著, 且温度、水分以及乙醇浓度对酒醅发酵前期(0–5 d)细菌群落演替具有重要作用。

关键词: 泸型酒, 酒醅, 细菌群落, 演替

基金项目: 国家“863 计划”(2012AA021301, 2013AA102106, 2014AA021501); 国家自然科学基金(31530055)

*通信作者。Tel/Fax: +86-510-85918206; E-mail: zhenghxu@jiangnan.edu.cn

收稿日期: 2018-03-27; 修回日期: 2018-04-22; 网络出版日期: 2018-06-22

泸型酒是我国浓香型白酒的典型代表,具有独特的风味,深受人民群众喜爱^[1-2]。泸型酒的生产以高粱为主要原料,以中温大曲为发酵剂,并通过固态发酵工艺产生丰富的白酒风味物质,包括酵母、霉菌、细菌在内的多种微生物类群参与了风味物质的合成^[1-3]。

细菌在泸型酒酿造酒醅、窖泥等生产环境中广泛存在,是泸型酒酒醅发酵过程中主要的产香动力^[1,3]。近年来,研究人员已采用微生物纯培养技术对酒醅发酵过程中细菌的多样性进行了研究,分离鉴定了多种具有耐酸、耐乙醇、产己酸等特性的细菌^[4-6],但是目前对于泸型酒固态发酵全过程的细菌群落演替规律及其影响因素尚缺少深入研究^[7-9]。本文采用高通量测序技术,对泸型酒酒醅发酵过程中细菌群落的演替规律进行分析,并探讨细菌群落演替与酒醅环境因素变化的相关性,为进一步阐明泸型酒发酵过程微生物酿造机理奠定研究基础。

1 材料与方法

1.1 样本采集

选取正常连续生产(30 年左右)窖池,取不同发酵时间(第 0、1、2、3、4、5、6、7、8、11、17、20、25、30、35 和 40 天),在窖池中心位置附近取样(3 个平行样),装入灭菌的塑封袋中混匀后置于-80 °C 冰箱中保存。

1.2 酒醅环境因素分析

温度测定:采用数显温度计对窖池内酒醅温度进行测定;

酒醅水分和酸度的测定:具体步骤参照沈怡方^[1]固体发酵酒醅分析方法;

酒醅乙醇浓度的测定:取 100 g 酒醅至 500 mL

玻璃蒸馏器中,加蒸馏水 200 mL,收集馏出液 100 mL,采用 DMA 35 便携式密度计测定酒醅中乙醇的含量。

1.3 酒醅宏基因组提取

称取 5.0 g 酒醅至灭菌的陶瓷研钵中,加入液氮研磨,使酒醅呈粉末状。准确取 1.0 g 酒醅粉末至灭菌 50 mL 离心管中,加入 1 mL CTAB 抽提液 [CTAB 2% (W/V), NaCl 1.4 mol/L, EDTA 20 mmol/L, Tris-HCl 100 mmol/L, pH 8.0] 和 20 μ L 巯基乙醇, 65 °C 恒温混匀仪振荡 30 min,加入 5 μ L 蛋白酶 K (20 mg/mL), 37 °C 条件下 220 r/min 振荡 30 min, 室温 6000 \times g 离心 10 min, 收集上清。加入等体积酚:氯仿:异戊醇(25:24:1), 12000 r/min 离心 10 min, 取上清;加入等体积氯仿:异戊醇(24:1), 12000 r/min 离心 10 min, 取上清, 重复操作 2 次;最后向上清液中加入 0.6 倍体积预冷的异丙醇-20 °C 沉淀 1 h, 12000 r/min 离心 10 min, 小心倒掉液体。沉淀用预冷 70%乙醇洗涤数次, 12000 r/min 离心 10 min, 收集沉淀, 将洗涤后的 DNA 吹干, 然后用 100 μ L TE 缓冲溶液溶解, -80 °C 保存。

1.4 16S rRNA 基因序列扩增及高通量测序

采用细菌通用引物 P1/P2 扩增酒醅中细菌 16S rRNA 基因 V1/V3 高变区(大肠杆菌 16S rRNA 基因位点 5-534)^[10], 并进行 PCR 产物纯化、文库建立以及上机测序^[10]。

1.5 数据处理与分析

采用 Mothur^[11](version 1.22)对测序数据进行分析。序列质检标准:小于 150 bp、平均质量得分小于 20、包含模糊碱基及包含 8 个以上连续相同碱基。根据 barcode 对本序列归类, 并去除 barcode 以及引物, 最终得到有效序列。使用 UCLUST 算法按照 97%相似度对序列进行 OTU

(operational taxonomic units, 可操作分类学单元) 划分, 并利用 Greengenes 数据库对各 OTU 进行分类学注释, 并计算 Shannon 指数、Ace 指数、Chao1 指数及文库覆盖率(Coverage)。计算 Bray-Curtis 相异性指数并对不同样本间进行聚类分析和 Metastats 分析(<http://metastats.cbcb.umd.edu/>)。采用 R (version 3.4.0) vegan 软件包中(version2.4-4) Mantel test^[12]分析酒醅环境因素变化与细菌群落演替的相关性。

2 结果和分析

2.1 酒醅环境因素的变化规律

泸型酒酒醅发酵过程中温度、水分、酸度和乙醇浓度的变化如图 1 所示。酒醅温度随着发酵进行缓慢升高, 在 17 d 达到 29.5 °C 并维持 8 d 左右, 25 d 之后温度逐渐下降, 呈现“前缓, 中挺, 后缓落”趋势。酒醅水分随着发酵时间持续增加,

在 30 d 时达到最大(63.2%), 随后略有下降, 这可能与泸型酒酿造后期采取的滴窖和舀黄水操作有关(将酒醅中的黄浆水滴出并排走, 避免黄水味从母糟带入酒中, 为后期蒸馏操作和下排发酵创造一个较好的环境)。酒醅酸度在 0–20 d 缓慢上升至 0.18 mmol/g, 随后在 15 d 内升高至 0.27 mmol/g, 随后略有下降, 可能与酸类物质作为底物进一步被微生物利用, 或者与乙醇进一步反应转为酯类物质有关。酒醅乙醇浓度在发酵前 7 d 增长缓慢, 7–30 d 迅速增加至 3.9%, 随后有所下降。

2.2 细菌菌群测序数据统计

通过高通量测序, 在整个发酵过程样品中共获得 95881 条有效序列, 每个样本中的有效序列见表 1。如表 1 所示, 发酵过程中酒醅样本中 OTUs 的数目为 44–1127 个, Ace 指数为 123.1–2606.8, Chao1 指数为 65.4–2038.7, Shannon 指数为 2.1–5.8。文库覆盖率(Coverage)反映测序深度是否

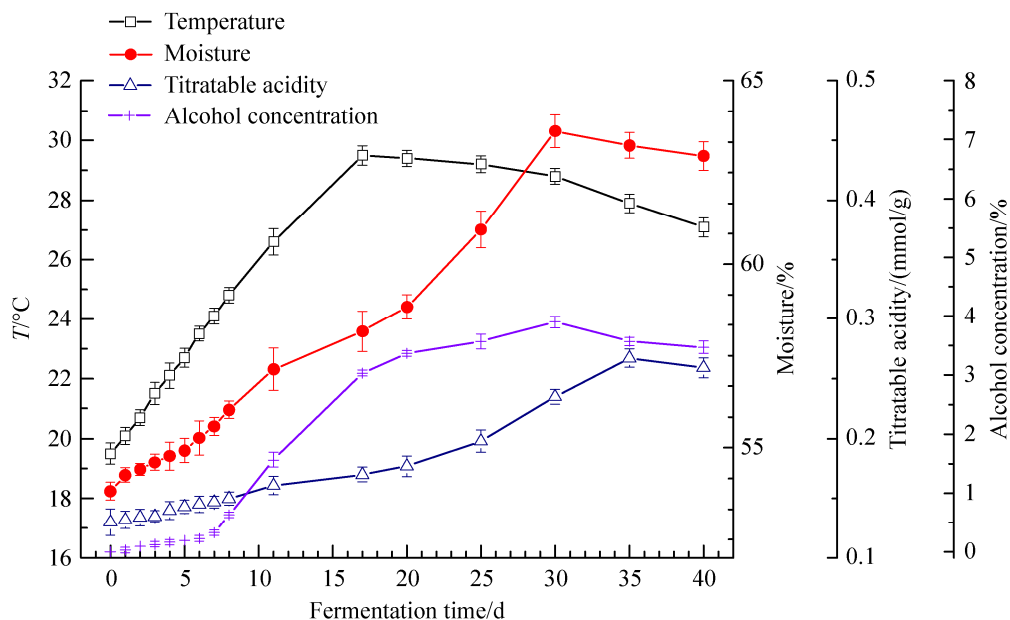


图 1. 酒醅环境因素发酵变化

Figure 1. Dynamics of environmental factors in fermented grains through fermentation.

表 1. 酒醅细菌群落测序数据统计分析

Table 1. Sequencing data of bacterial community in fermented grains

Day	OTUs	Ace	Chao1	Shannon	Coverage/%
0	369	760.6	598.0	3.4	97.0
1	407	1029.5	711.5	3.5	96.6
2	1127	2606.8	2038.7	5.8	90.0
3	777	1770.2	1260.2	5.1	90.8
4	419	1183.7	791.9	3.7	95.0
5	751	1885.2	1264.3	5.0	92.0
6	395	1312.0	888.3	3.6	95.0
7	576	1514.4	1066.6	4.0	95.0
8	434	1018.6	785.0	3.5	96.9
11	782	1888.3	1386.7	4.3	94.8
17	856	1790.5	1342.6	3.9	97.0
20	270	976.5	604.0	3.0	96.3
25	596	1729.5	1192.5	4.4	92.7
30	462	1207.8	878.2	3.5	95.9
35	452	1328.9	959.0	3.3	95.5
40	44	123.1	65.4	2.1	99.6

能覆盖整个微生物群落,是否能代表样本中所有微生物的真实情况,Coverage 越接近 1,则表示测序数据越能完整地反映出样本中微生物群落的组成。本研究中,所有测序样本的 Coverage 为 90.0%–99.6%,说明测序结果能基本反映泸型酒酒醅菌群组成信息。

2.3 细菌群落的发酵演替规律

泸型酒酒醅发酵过程中细菌群落(属水平)的演替规律如图 2 所示。整个发酵过程中,共检测到 30 个细菌门类,其中以 Firmicutes、Proteobacteria、Bacteroidetes 及 Actinobacteria 为优势门类,分别占总序数的 75.5%、12.7%、8.2%、1.7%。

在酒醅发酵过程中一共检测到 397 个属的细

菌,主要为 *Lactobacillus*、*Bacillus*、*Weissella*、*Dysgonomonas*、*Comamonas* 和 *Ruminococcus* (相对丰度>1.0%) (图 2)。*Lactobacillus* 的相对丰度从初始的 2.1% (0 d)迅速提高至 77.0% (4 d),随后有所波动,30 d 后其相对丰度保持在 70.0%以上;*Weissella* 的相对丰度从初始的 46.5% (0 d)快速下降至 0.4% (3 d),并在发酵后期保持在一个较低的水平(相对丰度<1.0%);*Bacillus* 的相对丰度从初始的 6.3% (0 d)迅速增长至 58.6% (1 d),随后快速降低并在发酵 6 d 后保持在 0.5%以下,这可能与发酵过程中环境因素的变化有关,因为随着发酵进行,窖池逐渐进入厌氧和高渗环境,该环境对芽孢杆菌的生长有抑制作用;*Comamonas*

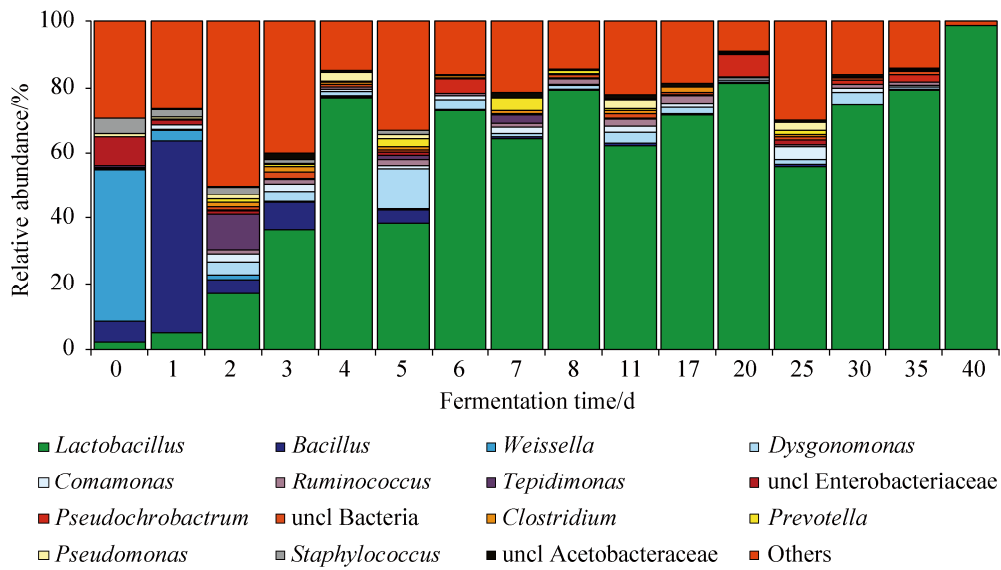


图 2. 酒醅发酵过程中细菌群落属水平分布

Figure 2. Genus-level distribution of bacterial community during fermentation process of fermented grains. Bacterial sequences that were not identified into greengenes database were ‘unclassified’ (abbreviation ‘uncl’); rare groups shown as ‘Others’ which relative abundance of taxon was less 0.5%.

和 *Ruminococcus* 的相对丰度在发酵第 3 天达到最大值(2.4%和 1.5%)，并在发酵后期保持在较低水平(相对丰度<1.0%)；*Dysgonomonas* 在初始阶段几乎检测不到，随发酵进行到第 5 天，其相对丰度达到 12.5%，随后快速下降并在 0.5%–4.0% 变动。

2.4 细菌群落演替的聚类分析

沈怡方等^[1]依据固态法酿造特点把整个白酒发酵过程划分为 3 个阶段：(1) 主发酵期；(2) 产酸期；(3) 产酯期，其中主发酵期的特点是边糖化边发酵。本研究中，通过计算细菌群落的 Bray-Curtis 相异性指数，可将不同发酵时间的酒醅样本进行聚类，并根据聚类结果将发酵过程划分为 3 个阶段：阶段 I (0–5 d)，阶段 II (6–17 d) 和阶段 III (18–40 d) (图 3)。通过分子方差分析 (AMOVA)，所得结果表明阶段 I-阶段 II-阶段 III

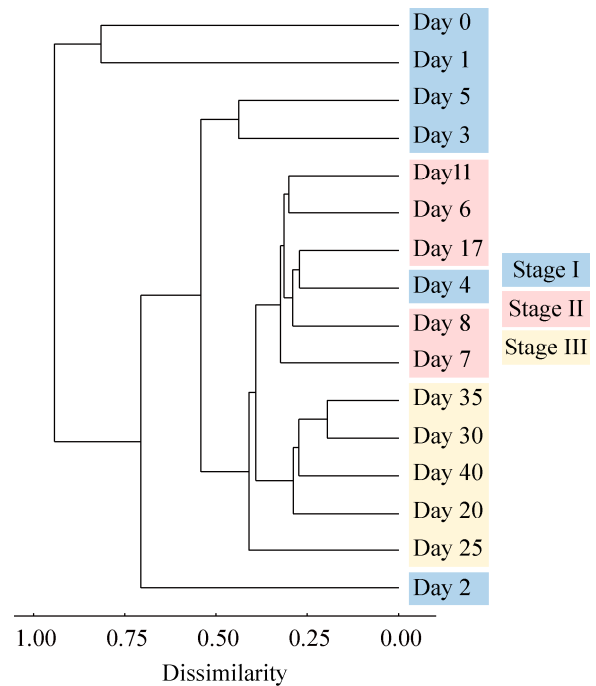


图 3. 基于 Bray-Curtis 相异性指数的发酵酒醅样本聚类分析

Figure 3. Clustering analysis of samples of fermented grains based on the Bray-Curtis dissimilarity.

之间差异极其显著($P<0.001$), 阶段 I-阶段 II、阶段 I-阶段 III 以及阶段 II-阶段 III 之间差异非常显著($P=0.015$ 、 $P=0.005$ 、 $P<0.001$)。通过 Metastats 分析, 获得各阶段酒醅细菌群落中的差异微生物 (OTU 水平) 信息: 与阶段 I 相比, 阶段 II 酒醅细菌群落中 *Lactobacillus* 和 unclassified Lactobacillaceae 相对丰度显著升高 ($P<0.05$), 而 unclassified Bacillaceae、*Staphylococcus*、*Bacillus*、unclassified Enterobacteriaceae、*Lactococcus*、*Pseudomonas*、*Thermoactinomyces*、*Leuconostoc*、*Staphylococcus* 相对丰度显著降低 ($P<0.05$)。与阶段 II 相比, 阶段 III 酒醅细菌群落中 *Lactobacillus* 相对丰度显著增长 ($P<0.05$), *Comamonas*、*Acetobacter*、unclassified Bacilli、*Clostridium*、*Bacillus*、*Ruminococcus*、unclassified Porphyromonadaceae 和 unclassified Streptophyta 相对丰度显著下降 ($P<0.05$)。

2.5 细菌群落演替与环境因素变化的相关性

不同阶段环境因素与微生物群落结构之间相关性的结果如表 2 所示。

阶段 I 的细菌菌群演替与酒醅温度、水分和乙醇浓度变化线性相关 ($P<0.05$)。酒醅发酵阶段 I

中, 大量微生物快速繁殖和代谢, 能够提高酒醅温度、改变酒醅含水量, 进而又影响酒醅中不适应温度和水分变化的微生物生长代谢, 影响微生物群落结构的变化。另一方面, 酿酒功能微生物能够利用淀粉、蛋白等原料代谢产生有机酸、乙醇等代谢物, 从而改变了酒醅酸度、乙醇浓度等环境变量, 并影响了对酸度和酒精度变化敏感的微生物生长和代谢。另外, 发酵阶段 I 的窖池内氧气逐渐耗尽并形成厌氧环境, 会对微生物生长和代谢产生重要影响, 其中氧气浓度变化与菌群演替的相关性尚需要进一步研究。

阶段 II 和阶段 III 的细菌菌群演替与酒醅温度、水分、酸度、乙醇均没有显著相关性 ($P>0.05$)。这可能与 Mantel test 属于线性分析模型相关, 而本研究中发酵阶段 II 和阶段 III 的细菌菌群演替和环境因素变化的相关性可能不是简单的线性关系。例如, 发酵中后期酒醅中微生物代谢生成的有机酸、乙醇等物质会发生酯化反应, 酒醅中代谢物的合成与转化分解同时存在。因此, 泸型酒发酵中后期细菌群落演替与环境因素的关系较为复杂, 尚需要深入研究。

表 2. 细菌群落演替与环境因素变化的相关性

Table 2. Correlation between environmental factor dynamics and bacterial community succession in fermented grains

Environmental factors	Bacteria ^a (stage I)		Bacteria (stage II)		Bacteria (stage III)	
	<i>r</i>	<i>P</i>	<i>r</i>	<i>P</i>	<i>r</i>	<i>P</i>
Temperature	0.63	0.011	-0.21	0.720	-0.12	0.558
Moisture	0.78	0.004	-0.20	0.675	0.21	0.283
Titrateable acidity	0.36	0.092	-0.20	0.675	0.09	0.358
Alcohol concentration	0.75	0.006	-0.18	0.675	-0.19	0.583

^a *r*, Spearman correlation coefficient; $P<0.05$ indicates a significant correlation. Stage I, 0 d to 5 d; Stage II, 6 d to 17 d; Stage III, 18 d to 40 d.

3 讨论

酒醅中的微生物群落对泸型酒主体风味物质的形成具有重要作用。在前期研究中, 窦晓和王涛等采用纯培养方法从泸型酒酒醅中获得 103 种(35 个属)的细菌菌株^[13-14], Zhang 等采用 PCR-DGGE 以及克隆文库的方法获得了泸型酒酒醅中 12 个属的细菌信息^[15-16], 本研究采用高通量测序方法在泸型酒酒醅发酵过程中共发现 397 个属的细菌, 进一步丰富了我们对泸型酒细菌群落组成多样性的认识。

在发酵阶段 I (0-5 d), 酒醅细菌群落主要由 *Lactobacillus*、*Bacillus*、*Weissella*、*Dysgonomonas*、*Comamonas* 和 *Ruminococcus* 组成, 随着发酵进行 (6-40 d), *Lactobacillus* 逐渐成为优势微生物(相对丰度 >70%), 这与前期研究结果一致^[13-14,16]。*Lactobacillus* 也是酱香型白酒酒醅以及清香型白酒酒醅中的主要细菌^[17-18]。芽孢杆菌(*Bacillus*)作为发酵阶段 I (0-5 d)主要的细菌菌群,而在发酵中后期相对丰度在 0.5%以下, 这与向文良等^[19]和 Zhang 等^[16]采用微生物免培养法的研究结果基本一致, 而与窦晓等采用微生物纯培养方法^[13]的研究结果并不一致, 这可能是由于芽孢杆菌较容易分离培养, 而发酵后期的乳酸菌在 MRS 培养基及好氧条件下较难培养有关。*Weissella* 作为另一类主要的广泛存在于传统发酵食品中的乳酸菌^[20], 主要出现在酒醅发酵的前期(0-5 d), 而在发酵后期已经很少或者检测不到, 且 *Weissella* 在中温大曲中含量较高^[21], 推测其可能来自大曲, 而在酒醅发酵过程中逐渐减少。具有降解木质素、纤维素功能的 *Comamonas*^[22]、*Dysgonomonas*^[23]、*Ruminococcus*^[24]有利于降解发酵过程中谷物原

料, 为其他微生物提供碳源。其他在酒醅发酵过程中的菌群, *Clostridium*^[16]的微生物能够分解有机物为有机酸、醇类物质、CO₂/H₂ 等, 并且还具有生成丁酸、己酸的能力, 而这些都是泸型酒的典型风味物质。因此, 浓香型酒醅中细菌的多样性以及群落的组成是泸型酒风味形成的重要因素。

通过分析泸型酒酒醅发酵过程中细菌群落演替规律, 发现细菌群落结构的变化具有阶段性, 因此结合沈怡方等^[1]对固态酿造白酒的生产实践总结, 我们将酒醅发酵过程分为 3 个阶段 (0-5 d、6-17 d 和 18-40 d)。前期研究发现, 酸度、乙醇含量、水分含量是影响泸型酒酒醅微生物群落结构组成的主要环境因素^[25], 但是对于这些环境因素在 3 个酿造阶段中对菌群演替的影响尚不明确。本研究结果表明温度、水分和乙醇浓度在发酵阶段 I (0-5 d)与细菌群落演替具有显著的线性相关性($P < 0.05$), 其原因可能是酒醅进入窖池后细菌生长旺盛, 导致酒醅温度、水分和乙醇浓度上升, 因此在泸型酒生成过程中对于酒窖中温度、水分等因素的控制具有重要意义, 能够直接影响白酒的产量与品质^[26-27]。在阶段 II (6-17 d)和阶段 III (18-40 d), 4 种环境因素变化与细菌群落演替均没有显著线性相关性 ($P > 0.05$), 这可能与 Mantel test 属于线性分析模型, 而本研究中发酵阶段 II 和阶段 III 的细菌菌群演替和环境因子变化的相关性具有非线性有关。同时, 发酵中后期酒醅中微生物代谢生成的有机酸、乙醇等物质会发生酯化反应, 酒醅中代谢物的合成与转化分解同时存在^[28], 因此酒醅酸度、乙醇浓度等环境因子的变化与细菌的生长代谢可能存在非线性相关性。另外, 由于酒醅内

微生物的生长代谢,窖池内氧气逐渐耗尽并形成厌氧环境,会对酒醅中微生物群落造成重要影响,因此氧气浓度变化与菌群演替的相关性需要进一步的研究。

本文利用高通量测序技术研究泸型酒发酵过程中酒醅细菌群落结构,揭示了发酵过程中酒醅丰富多样的细菌类群,并分阶段分析了与细菌群落演替具有相关性的环境因素,发现温度、水分以及乙醇浓度可能是影响前期细菌群落结构的重要环境因素,为进一步阐明泸型酒发酵过程微生物酿造机理奠定研究基础。

参 考 文 献

- [1] 沈怡方. 白酒生产技术全书. 北京: 中国轻工业出版社, 2007.
- [2] Tao Y, Li JB, Rui JP, Xu ZC, Zhou Y, Hu XH, Wang X, Liu MH, Li DP, Li XZ. Prokaryotic communities in pit mud from different-aged cellars used for the production of Chinese strong-flavored liquor. *Applied and Environmental Microbiology*, 2014, 80(7): 2254–2260.
- [3] Hou XG, Wang JY, Li XS, Hu BY, Li SL, Gao YY. The research progress on functional aroma-producing microorganisms in *Zaopei* and pit mud of Chinese strong-flavor liquor. *Microbiology China*, 2013, 40(7): 1257–1265. (in Chinese)
侯小歌, 王俊英, 李学思, 胡炳义, 李绍亮, 高应运. 浓香型白酒糟醅及窖泥产香功能菌的研究进展. *微生物学通报*, 2013, 40(7): 1257–1265.
- [4] Wu Q, Peng SQ, Yu Y, Li YX, Xu Y. Genome sequence of *Bacillus licheniformis* CGMCC3963, a stress-resistant strain isolated in a Chinese traditional solid-state liquor-making process. *Genome Announcements*, 2013, 1(1): e00060–12.
- [5] 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.
- [6] Yao WC, Tang YM, Ren DQ. White wine cellar mud key functions of Luzhou-flavor liquor cultivating the optimization. *Liquor Making*, 2010, 37(6): 18–21. (in Chinese)
姚万春, 唐玉明, 任道群. 浓香型白酒窖泥关键功能菌的优化培养. *酿酒*, 2010, 37(6): 18–21.
- [7] Ye GB, Luo HB, Yang XD, Li DY, Wang Y, Ni B. Community structure of prokaryotes in pit mud of Lu-flavor liquor from Luzhou prefecture based on culture-independent approach. *Food Science*, 2013, 34(17): 176–181. (in Chinese)
叶光斌, 罗惠波, 杨晓东, 李丹宇, 王毅, 倪斌. 基于免培养法研究泸州地区浓香型白酒窖泥原核微生物群落结构. *食品科学*, 2013, 34(17): 176–181.
- [8] Li XR, Ma EB, Yan LZ, Meng H, Du XW, Zhang SW, Quan ZX. Bacterial and fungal diversity in the traditional Chinese liquor fermentation process. *International Journal of Food Microbiology*, 2011, 146(1): 31–37.
- [9] Wang XS, Du H, Xu Y. Source tracking of prokaryotic communities in fermented grain of Chinese strong-flavor liquor. *International Journal of Food Microbiology*, 2017, 244: 27–35.
- [10] Huang S, Yang F, Zeng XW, Chen J, Li R, Wen T, Li C, Wei W, Liu JQ, Chen L, Davis C, Xu J. Preliminary characterization of the oral microbiota of Chinese adults with and without gingivitis. *BMC Oral Health*, 2011, 11: 33.
- [11] Schloss PD, Westcott SL, Ryabin T, Hall JR, Hartmann M, Hollister EB, Lesniewski RA, Oakley BB, Parks DH, Robinson CJ, Sahl JW, Stres B, Thallinger GG, van Horn DJ, Weber C. Introducing mothur: open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities. *Applied and Environmental Microbiology*, 2009, 75(23): 7537–7541.
- [12] Hollister EB, Engledow AS, Hammett AJM, Provin TL, Wilkinson HH, Gentry TJ. Shifts in microbial community structure along an ecological gradient of hypersaline soils and sediments. *The ISME Journal*, 2010, 4(6): 829–838.
- [13] Dou X, Han PJ, Liu L, Zhang YH, He JM, Zhuo XX, Wu YY, Bai FY, Yang JG. Study on isolation and identification and population succession law of bacterial in fermented grains during the brewing of Luzhou-flavour liquor. *Science and Technology of Food Industry*, 2017, 38(1): 169–174. (in Chinese)
窦晓, 韩培杰, 刘莉, 张雨涵, 贺佳美, 卓晓轩, 吴依阳, 白逢彦, 杨建刚. 泸型酒酿造期间酒醅中可培养细菌的分离鉴定及其种群演替规律研究. *食品工业科技*, 2017,

- 38(1): 169–174.
- [14] Wang T, Zhao D, Tian SP, You L, Wang S, Feng RZ, Feng XY, Zhang Y, Cui XL. Phylogenetic diversity of cultivable bacteria during the brewing process of the Luzhou-flavor liquor in Yibin, Sichuan province, China. *Acta Microbiologica Sinica*, 2011, 51(10): 1351–1357. (in Chinese)
王涛, 赵东, 田时平, 游玲, 王松, 冯瑞章, 冯学愚, 张云, 崔晓龙. 宜宾浓香型白酒酿造过程中可培养细菌的系统发育多样性. *微生物学报*, 2011, 51(10): 1351–1357.
- [15] Qiao ZW, Zhang WX, Zhang LY, Zhang QS, Yue YY. Analysis on microbes in brewing mass of strong aromatic spirits during fermentation. *Liquor Making*, 2005, 32(1): 18–22. (in Chinese)
乔宗伟, 张文学, 张丽莺, 张其圣, 岳元媛. 浓香型白酒发酵过程中酒醅的微生物区系分析. *酿酒*, 2005, 32(1): 18–22.
- [16] 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.
- [17] Huang YL, Huang YG, Hu JF, Hu F, Zhong FD. Microbial diversity of the second rounds liquid of Moutai-flavor *Baijiu* during fermentation process. *China Brewing*, 2017, 36(9): 30–35. (in Chinese)
黄蕴利, 黄永光, 胡建峰, 胡峰, 钟方达. 酱香型白酒第二轮次酒发酵过程微生物多样性研究. *中国酿造*, 2017, 36(9): 30–35.
- [18] 王海燕. PCR-DGGE 技术对清香型汾酒微生物群落结构演变规律的研究. 无锡: 江南大学博士学位论文, 2014.
- [19] 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.
- [20] Ren C, Du H, Xu Y. Advances in microbiome study of traditional Chinese fermented foods. *Acta Microbiologica Sinica*, 2017, 57(6): 885–898. (in Chinese)
任聪, 杜海, 徐岩. 中国传统发酵食品微生物组研究进展. *微生物学报*, 2017, 57(6): 885–898.
- [21] Xiao C, Lu ZM, Zhang XJ, Wang ST, Ao L, Shen CH, Shi JS, Xu ZH. Bio-heat is a key environmental driver shaping microbial community of medium-temperature Daqu. *Applied and Environmental Microbiology*, 2017, 83(23): e01550–17.
- [22] 张佩佩. 细菌 *Comamonas serinivorans* C35 对木质素的降解及其代谢机制初步研究. 江苏大学硕士学位论文, 2017.
- [23] Zhang ML, Liu N, Qian CL, Wang QF, Wang Q, Long YH, Huang YP, Zhou ZH, Yan X. Phylogenetic and functional analysis of gut microbiota of a fungus-growing higher termite: Bacteroidetes from higher termites are a rich source of β -glucosidase genes. *Microbial Ecology*, 2014, 68(2): 416–425.
- [24] Ze XL, Duncan SH, Louis P, Flint HJ. *Ruminococcus bromii* is a keystone species for the degradation of resistant starch in the human colon. *The ISME Journal*, 2012, 6(8): 1535–1543.
- [25] Zhang DF, Li K, Liu S, Liu RC, Xing YG, Li MY, Che ZM, Xiang WL. Microbial community succession of Chinese Luzhou-flavor liquor lees. *Food Science*, 2012, 33(15): 183–187. (in Chinese)
张大凤, 李可, 刘森, 刘若尘, 邢亚阁, 李明元, 车振明, 向文良. 中国浓香型白酒窖池糟醅中微生物群落演替分析. *食品科学*, 2012, 33(15): 183–187.
- [26] Zhang GS, Hu HY, Feng H. Relations between atmospheric temperature and technical parameters/liquor yield/quality liquor rate in liquor production. *Liquor-Making Science & Technology*, 2017, (7): 77–79. (in Chinese)
张广松, 胡海洋, 冯浩. 酿酒生产过程气温与工艺参数及两率的关系. *酿酒科技*, 2017, (7): 77–79.
- [27] Zhao JL, Zhang HX, Zhang XH. Effect of low acid environment on fermentation of fen-flower liquor. *China Brewing*, 2013, 32(8): 35–38. (in Chinese)
赵景龙, 张红霞, 张秀红. 低酸环境对汾酒酿造的影响. *中国酿造*, 2013, 32(8): 35–38.
- [28] Zhang YY, Zhu XY, Li XZ, Tao Y, Jia JJ, He HX. The process-related dynamics of microbial community during a simulated fermentation of Chinese strong-flavored liquor. *BMC Microbiology*, 2017, 17: 196.

Bacterial community succession in fermented grains of Luzhou-flavor baijiu

Chen Xiao^{1,2}, Zhenming Lu^{2,4}, Xiaojuan Zhang^{2,4}, Songtao Wang⁵, Delin Li⁵,
Caihong Shen⁵, Jinsong Shi³, Zhenghong Xu^{1,2,4,5*}

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

²National Engineering Laboratory for Cereal Fermentation Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu Province, China

³School of Pharmaceutical Science, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu Province, China

⁴Jiangsu Engineering Research Center for Bioactive Products Processing Technology, Wuxi 214122, Jiangsu Province, China

⁵National Engineering Research Center of Solid-State Brewing, Luzhou 646000, Sichuan Province, China

Abstract: [Objective] This study aimed to elucidate the bacterial community succession and its underlying relevance to the environmental factors in fermented grains of Luzhou-flavor baijiu. [Methods] The 16S rRNA gene amplicon sequencing analysis was applied to reveal the succession of bacterial community in the fermented grains, and Mantel test was used to correlate bacterial community succession with environmental factors. [Results] A total of 397 bacterial genera were identified in fermented grains, including *Lactobacillus*, *Bacillus*, *Weissella*, *Dysgonomonas*, *Comamonas* and *Ruminococcaceae* (relative abundance > 1.0%). Fermentation process was divided into three stages: stage I (0–5 d), stage II (6–17 d) and stage III (18–40 d) according to clustering analysis, and the bacterial community structure was significantly different among these three stages. Metastats analysis demonstrated that the relative abundance of *Lactobacillus* and unclassified Lactobacillales in stage II was significantly higher than that in stage I ($P < 0.05$), whereas the situation of unclassified Bacillaceae, *Staphylococcus*, *Bacillus*, unclassified Enterobacteriaceae, *Lactococcus*, *Pseudomonas*, *Thermoactinomyces*, *Leuconostoc* and *Staphylococcus* quite the reverse ($P < 0.05$). Compared with stage II, the relative abundance of *Lactobacillus* increased in stage III ($P < 0.05$), conversely, downregulation dominated *Comamonas*, *Acetobacter*, unclassified Bacilli, *Clostridium*, *Bacillus*, *Ruminococcus*, unclassified Porphyromonadaceae and unclassified Streptophyta ($P < 0.05$). Results of Mantel test indicated that the bacterial community succession in the stage I was correlated with the dynamics of temperature, moisture, and alcohol concentration ($P < 0.05$), whereas no significant correlation was observed between environmental factors and bacterial community succession in the stage II and III ($P > 0.05$). [Conclusion] Our work demonstrated the dramatically divergent bacterial community structure in the fermented grains of Luzhou-flavor baijiu from different brewing stages. Temperature, moisture and alcohol concentration significantly correlated with the bacterial community succession in early stage of fermentation (0–5 d).

Keywords: Luzhou-flavor baijiu, fermented grains, bacterial community, succession

(本文责编: 李磊)

Supported by the National High Technology Research and Development Program of China (863 Project) (2012AA021301, 2013AA102106, 2014AA021501) and by the National Natural Science Foundation of China (31530055)

*Corresponding author. Tel/Fax: +86-510-85918206; E-mail: zhenghuxu@jiangnan.edu.cn

Received: 27 March 2018; Revised: 22 April 2018; Published online: 22 June 2018