



芝麻香型白酒微生物多样性及其与胁迫因子相关性

崔凤娇 李一关 高大禹 陈建新*

江南大学生物工程学院 粮食发酵工艺与技术国家工程实验室 江苏 无锡 214122

摘要:【背景】近年来芝麻香型白酒的生产工艺日臻成熟,然而相应的科学研究却没有同步发展起来。高通量测序技术越来越多地应用于物种多样性的研究,但偏重于研究物种的相对丰度,没有关注物种的生物数量。【目的】深度解析芝麻香型白酒发酵过程微生物群落结构变化及其与胁迫因子相关性,并研究主要酵母菌与细菌的相关性,为揭示芝麻香型白酒发酵机理和控制发酵质量提供理论支撑。

【方法】使用 Thermofisher 的 Ion S5™XL 测序平台进行 16S rDNA 和 ITS rDNA 扩增子高通量测序,结合微生物传统的定量方法,测定芝麻香型白酒发酵过程微生物群落结构的变化,同时监测发酵过程乳酸、乙酸、乙醇的含量变化,通过样品复杂度分析、多样品比较分析、环境因子关联性分析探究发酵过程微生物群落及其与胁迫因子的关系。通过 Pearson 相关性分析酵母菌与细菌的相关性。【结果】发酵前期纤维素菌、魏斯氏菌和芽孢杆菌占主要优势,发酵中后期乳杆菌占绝对优势,其次是纤维素菌、魏斯氏菌和芽孢杆菌。整个发酵过程伊萨酵母占绝对优势,其次是维克霉菌、酿酒酵母、假丝酵母。大部分微生物与胁迫因子呈负相关,只有乳杆菌与乙酸呈极显著性正相关。酵母菌与部分细菌呈正相关性。【结论】白酒发酵过程胁迫因子和微生物间的相互作用促进了群落演替过程,发酵后期乳杆菌和芽孢杆菌发酵产酸抑制了大部分不耐酸菌,有机酸是影响群落结构变化的主要胁迫因子。微生物数量结合相对丰度揭示了发酵过程群落结构演替及其与环境因子相关性的更多信息。

关键词: 芝麻香型白酒, 微生物多样性, 胁迫因子, 高通量测序

Microbial diversity and its relationships with stress factors in sesame-flavor liquor fermentation process

CUI Feng-Jiao LI Yi-Guan GAO Da-Yu CHEN Jian-Xin*

National Engineering Laboratory for Cereal Fermentation Technology, School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi, Jiangsu 214122, China

Abstract: [Background] In recent years, the production technology of sesame-flavor liquor is becoming more and more mature. But the corresponding scientific research has not developed synchronously. High-throughput sequencing technology is increasingly used in the study of species diversity, but it focuses on the relative abundance of species rather than the microbial number of species. [Objective] The changes of microbial community structure and its correlation with stress factors during the fermentation of sesame-flavor liquor were analyzed, and the correlation between main yeasts and bacteria was also studied, to provide theoretical support for revealing the fermentation mechanism and controlling fermentation quality of sesame-flavor liquor. [Methods] The microbial community structure during the

*Corresponding author: Tel: 86-510-85197721; E-mail: jxchen@jiangnan.edu.cn

Received: 31-10-2018; Accepted: 27-12-2018

*通信作者: Tel: 0510-85197721; E-mail: jxchen@jiangnan.edu.cn

收稿日期: 2018-10-31; 接受日期: 2018-12-27

fermentation of sesame-flavor liquor was determined by traditional quantification of microorganisms and sequencing the bacterial 16S rDNA gene and the fungal ITS rDNA gene using Thermofisher's Ion S5TMXL sequencing platform. The contents of lactic acid, acetic acid and ethanol during the fermentation process were monitored. The microbial community and its relationship with stress factors during fermentation were analyzed by complexity analysis of samples, comparative analysis of samples and correlation analysis of environmental factors. The correlation between yeasts and bacteria was analyzed by Pearson correlation. **[Results]** Cellulose bacteria, *Westermania* and *Bacillus* were dominant in the early fermentation stage, and *Lactobacillus* was dominant in the middle and late fermentation stages, followed by cellulose bacteria, *Westermania* and *Bacillus*. *Issatchenkia* was the dominant yeast in the whole fermentation process, followed by *Wickerhamomyces*, *Saccharomyces cerevisiae* and *Candida*. Most microorganisms were negatively correlated with stress factors, and only *Lactobacillus* showed a significant positive correlation with acetic acid. Yeasts were positively correlated with some bacteria. **[Conclusion]** The interaction of stress factors and microbes in liquor fermentation process promoted the succession process of the community. The organic acids produced by *Lactobacillus* and *Bacillus* during the late stage of fermentation inhibited most of the acid-nonresistant microorganisms, and organic acids were the main stress factors affecting community structure. The combination of microbial quantity and relative abundance revealed more information about the succession of community structure and its correlation with environmental factors during fermentation.

Keywords: Sesame-flavor liquor, Microbial diversity, Stress factors, High throughput sequencing

芝麻香型白酒是 1957 年最初由山东景芝酒厂自主创新的香型, 以其独特的浓、酱、清香融合的生产工艺特点和优雅的芝麻香而在国内闻名^[1]。芝麻香型白酒独特的生产工艺^[1-2]赋予了其特殊的微生物区系。近年来, 国内学者开始重视对芝麻香型白酒的研究, 已经在微生物群落结构和菌种相互作用^[3-4]、风味物质^[5-6]等方面有了突出进展, 但相较于浓、酱、清香型三大香型白酒, 芝麻香型白酒的研究还需要进一步完善。

酒醅在密闭窖池中经过多种微生物共同发酵形成了复杂的白酒成分, 这些微量成分决定了白酒的风味与口感, 由此可见微生物的代谢活动对白酒的品质影响重大^[7]。发酵过程中, 随着微生物的生长代谢, 会产生多种化学因子反作用于微生物, 使微生物的种类和数量发生变化, 影响群落演替的轨迹。环境 pH 值是微生物生长过程中最重要的影响因素, 尤其是由弱有机酸引起的低 pH 值将影响酿酒酵母酒精发酵的速度和产物的组成^[8]。而在芝麻香型白酒中, 乳酸和乙酸的含量远远超出其他有机酸, 乙醇更是发酵的主产物, 因此有必要研究乙醇、乳酸和乙酸 3 种胁迫因子与发酵过程微生物群落

的相关性。国外学者对群落结构与胁迫因子相关性的研究主要集中在土壤和水环境: 采用焦磷酸测序技术、核糖体 DNA 指纹法、荧光原位杂交等分子手段和 UniFrac 距离法、单变量模型、主成分分析、偏最小二乘法等分析方法研究微生物群落及胁迫因子的影响^[9-12]。在国内白酒方面胁迫因子与微生物群落相关性的研究虽有文献^[13-15]报道, 但主要在大曲的发酵制备^[14-15]方面, 而且常作为大曲质量判定的一个方面。

通过高通量测序结合微生物总数定量方法, 将细菌多样性与真菌多样性结合起来分析, 打破以往白酒研究中仅侧重于细菌或真菌的研究现状, 揭示芝麻香型白酒发酵过程微生物群落结构变化, 并根据环境因子关联性分析得到微生物与胁迫因子的关系。这对理解白酒发酵机理, 理解微生物和胁迫因子的关系, 实现人为调控白酒发酵具有重要意义, 同时丰富了对芝麻香型白酒的研究, 为今后进一步拓宽芝麻香型白酒的研究提供思路。

1 材料与方法

1.1 材料

发酵第 0、4、15、30 天酒醅来自梅兰春酒厂,

分别命名为 FG1、FG2、FG3、FG4。采用三点取样法^[16]，取样后置于冰袋保温箱，迅速带回实验室转移至-70 °C 冰箱。

1.2 主要试剂和仪器

GeneJET 胶回收试剂盒，Thermo Scientific 公司；Ion Plus Fragment Library Kit 48 rxns 建库试剂盒，Ion S5TMXL 测序平台，ThermoFisher 公司。气相色谱仪，SHIMADZU 公司；高效液相色谱仪，Agilent 公司；纽扣温度计，Maxim 公司。

1.3 方法

1.3.1 酒醅基因组的提取

使用 CTAB 法^[17]提取酒醅基因组，每个样品做 3 个平行，琼脂糖凝胶电泳检测基因组质量后混合。

1.3.2 PCR 扩增及纯化

用无菌水将基因组样品稀释至 1 ng/μL，使用带 Barcode 的特异引物进行 PCR^[18-19]。使用 2% 浓度的琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物，根据 PCR 产物浓度进行等量混样，混匀后使用 2% 浓度的琼脂糖凝胶电泳纯化 PCR 产物，使用胶回收试剂盒剪切回收目标条带。

1.3.3 文库构建和上机测序

使用 ThermoFisher 公司的 Ion Plus Fragment Library Kit 48 rxns 建库试剂盒进行文库的构建，构建好的文库经过 Qubit 定量和文库检测合格后，使用 ThermoFisher 的 Ion S5TMXL 进行上机测序。

1.3.4 信息分析

使用 Cutadapt (Martin M., V1.9.1) 软件对数据进行过滤和质控后通过 UCHIME Algorithm^[20]与物种注释数据库进行比对检测并去除嵌合体序列^[21]，得到有效数据。利用 UPARSE 软件 (V7.0.1001)^[22]对有效数据进行聚类。用 Mothur 方法与 SILVA^[23]的 SSUrRNA 数据库^[24]进行物种注释分析。按最小样本序列数抽平后进行后续分析。使用 QIIME 软件 (V1.9.1) 和 R 软件 (V2.15.3) 进行多样性分析。

1.3.5 乙醇含量的测定

使用气相色谱仪测定乙醇含量^[25]。

1.3.6 乳酸和乙酸含量测定

采用高效液相色谱仪测定乳酸和乙酸含量^[26]。

1.3.7 细菌和酵母数量的测定

采用平板涂布法测定细菌和酵母数量^[27]。

1.3.8 发酵过程温度的测定

使用纽扣温度计，按三点取样^[16]方式设置测温点，测定发酵过程温度。

2 结果与分析

2.1 发酵过程胁迫因子浓度和总菌数变化

如表 1 所示，发酵中前期，乙醇和乙酸浓度呈升高趋势，到发酵后期又有轻微下降，这是因为发酵后期微生物数量下降，产酸能力下降，而乙醇和乙酸又具有较高的挥发性。发酵第 15 天乙醇和乙酸含量最高。乳酸浓度随发酵时间呈升高趋势，乳酸不易挥发的特性有利于它的积累。

采用传统平板计数法跟踪发酵过程总细菌和总酵母数量的变化。如表 2 所示，发酵过程中细菌总数先升高后下降，酵母菌总数一直呈下降趋势。发酵中后期细菌以绝对的数量优势抑制了酵母菌的增殖，此外随着发酵的进行氧气缺失，如图 1 所示，

表 1 发酵过程胁迫因子浓度

Table 1 Concentration of stress factors during the fermentation

发酵时间 Fermentation time (d)	乙醇浓度 Ethanol concentration (%)	乙酸浓度 Acetic acid concentration (mg/g)	乳酸浓度 Lactic acid concentration (mg/g)
0	0.66±0.21	0.42±0.34	10.17±0.37
4	5.51±0.16	0.49±0.28	9.28±0.26
15	6.25±0.21	4.52±0.19	20.21±0.23
30	4.08±0.24	2.94±0.36	29.02±0.41

表 2 发酵过程微生物数量

Table 2 Microbial quantity during the fermentation

样品 Samples	细菌总数 Number of bacteria Log(CFU/g)	酵母菌总数 Number of yeasts Log(CFU/g)
FG1	8.7±0.1	8.2±0.3
FG2	8.9±0.3	7.0±0.1
FG3	9.2±0.2	4.7±0.1
FG4	8.5±0.1	2.1±0.2

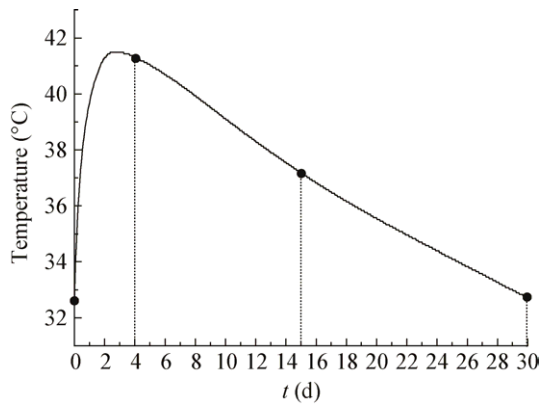


图 1 发酵过程温度曲线

Figure 1 The temperature curve of the fermentation process

注: 本实验所选取样时间点的温度以黑色圆圈标出。

Note: The temperature of the sampling point is marked by a black circle.

发酵前、中期温度的提高也是影响酵母菌数量的重要因素。

2.2 发酵过程微生物 α 多样性指数分析

测序结果经过严格的数据质控, 将相似性高于 97% 的序列聚类成 OTU, 微生物的 α 多样性指数见表 3。各样品的测序深度都达到 0.999 以上, 说明测序结果可以全面准确地反映物种信息。香农指数是反映群落多样性和物种均匀度的指标, Chao1 指数用于估计样品中的总物种数, PD 指数 (PD-whole-tree's index) 是衡量系统发育多样性的指数。由表 3 可看出, FG1 和 FG2 香农指数较大, 说明 FG1 和 FG2 样品物种多样性和均匀性较 FG3 和

FG4 高, 细菌总物种在发酵第 4 天达到最大值, 发酵后期环境湿润缺氧, 促进了丝状真菌的生长, 使真菌总物种数在发酵第 30 天达到最大值, 相应的物种系统发育多样性也达到最大值。发酵第 0 天和第 4 天, 发酵体系中环境适宜, 各种微生物均处于增长繁殖阶段, 因此物种分布较均匀; 随着发酵的进行, 微生物代谢积累了大量的酸类、醇类等物质, 会抑制大部分微生物的生长繁殖, 导致发酵第 15 和 30 天的物种均匀度和丰度都有所降低。

2.3 OTU 聚类和物种相对丰度分析

由图 2 可知, FG1、FG2、FG3、FG4 四个样品细菌共检测出 279 个 OTU, 其中共有相同种类 58 个, 4 个样品特有的微生物种类分别是 17、30、4、5, 由此可见, 样品 FG2, 即发酵第 4 天细菌多样性最高。真菌共检测出 168 个 OTU, 其中共有相同种类 74 个, 4 个样品特有的微生物种类分别是 3、3、6、25, 即发酵第 30 天真菌种类最多。

根据物种注释结果, 选取每个样品在属水平上最大丰度排名前 10 的物种, 生成物种相对丰度柱形累加图, 以便直观地查看各样品在不同分类水平上相对丰度较高的物种及其比例。由图 3 可知, 不同发酵阶段各物种丰度有很大不同, 优势物种随着发酵过程的群落演替会发生改变。发酵前期纤维素菌、魏斯氏菌和芽孢杆菌占主要优势, 发酵中后期乳杆菌占绝对优势, 这与王海燕等^[7]的研究结果一致, 其次是纤维素菌、魏斯氏菌和芽孢杆菌。发酵

表 3 微生物 α 多样性指数

Table 3 Microbial α diversity index

分类	样品	发现物种数	测序深度	香农指数	Chao1 指数	PD 指数
Class	Samples	Observed-species	Goods-coverage	Shannon index	Chao1 index	PD index
细菌 Bacteria	FG1	162	1.000	2.691	167.571	11.308
	FG2	227	0.999	3.786	332.857	14.460
	FG3	132	1.000	1.799	145.000	9.366
	FG4	177	1.000	2.686	187.969	13.853
真菌 Fungus	FG1	110	1.000	3.822	111.867	17.743
	FG2	109	1.000	3.708	114.500	16.991
	FG3	115	1.000	3.314	120.000	21.234
	FG4	135	0.999	3.689	152.250	23.212

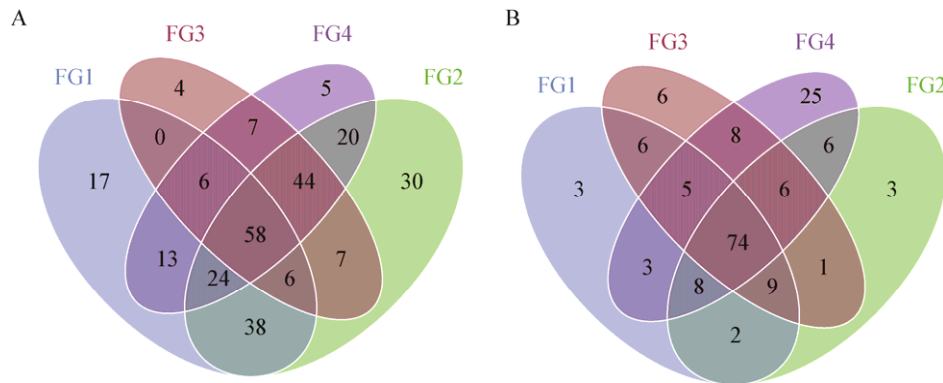


图2 基于 OTU 的 Venn 图

Figure 2 The Venn diagram of operational taxonomic unit

注: A: 细菌韦恩图; B: 真菌韦恩图.

Note: A: The Venn diagram of bacteria; B: The Venn diagram of fungus.

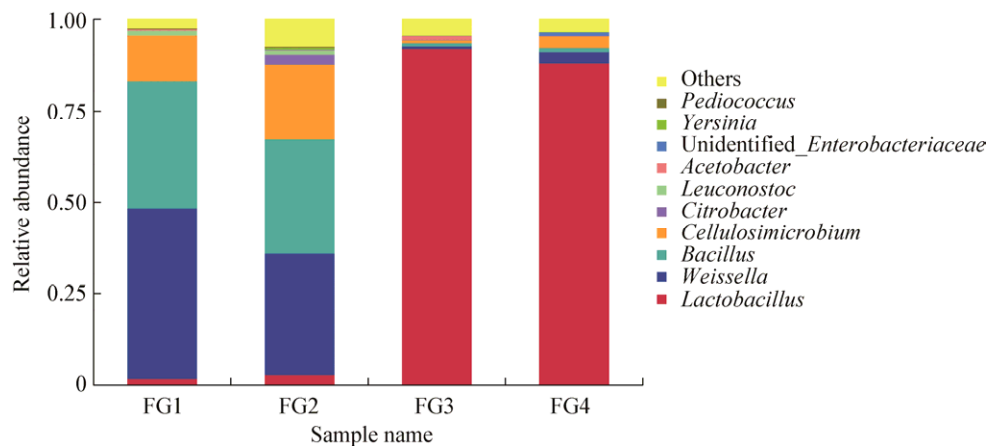


图3 属水平上的细菌物种相对丰度柱形图

Figure 3 The bar graph of bacterial relative abundance of species at genus level

前期芽孢杆菌和魏斯氏菌丰度较高,这与细菌曲的添加和车间生产环境有很大关系。随着发酵的进行,发酵体系中酸度升高,菌群结构进行自我调节,乳杆菌数量逐渐增多。

图4为最大丰度排名前10的真菌物种相对丰度柱形图。如图4所示,伊萨酵母占据了整个发酵过程真菌的绝对优势,这主要是因为伊萨酵母具有较高的抗酸、抗高温能力^[28]。其次是维克霉菌、酿酒酵母、假丝酵母。酵母曲的添加使酵母菌占据了真菌的绝对优势。

2.4 β 多样性指数热图分析

α 多样性主要反映样品本身的微生物多样性,

为了直观地反映不同样品之间微生物组成的差异,进一步分析发酵过程群落结构的演替规律,利用 β 多样性评估4个样品间微生物构成的差异。采用加权的 UniFrac 算法,同时考虑各样品中微生物的有无和丰度信息,结合微生物序列间的进化信息,得到样品间的差异系数。如图5所示为基于 Weighted UniFrac 距离的 β 多样性指数热图。从图5中可以直观地看出,FG1和FG2及FG3和FG4的细菌多样性差异小。FG1和FG3及FG2和FG4的真菌多样性差异小。细菌和真菌群落结构随着发酵过程的变化规律呈现出一定的差异性,可能跟不同发酵阶段优势物种的变化和物种总菌数的变化有关。

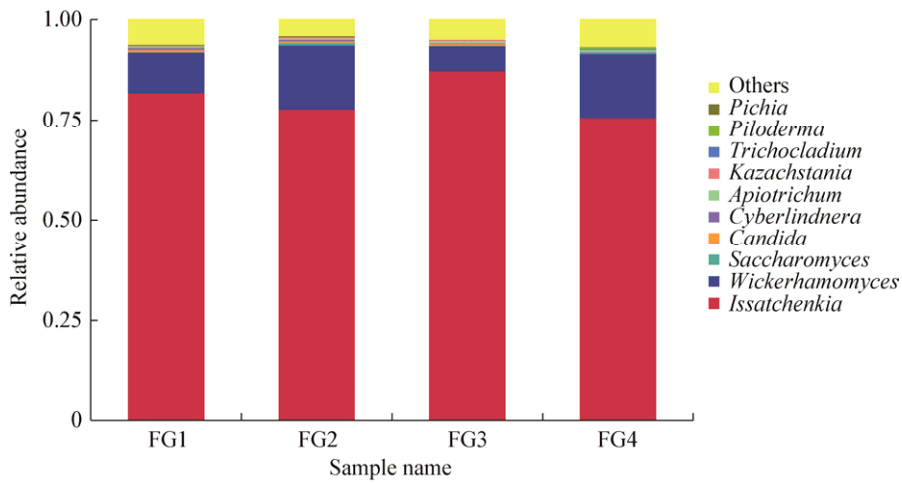


图 4 属水平上的真菌物种相对丰度柱形图
 Figure 4 The bar graph of fungal relative abundance of species at genus level

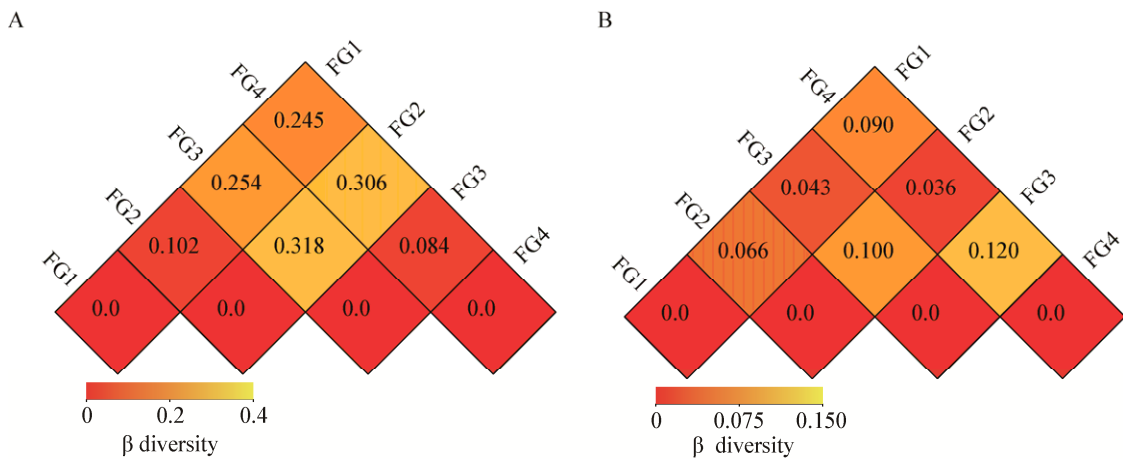


图 5 基于 Weighted UniFrac 距离的 β 多样性指数热图
 Figure 5 β diversity index thermogram based on Weighted UniFrac distance

注: A: 细菌 β 多样性指数热图; B: 真菌 β 多样性指数热图.
 Note: A: β diversity index thermogram of bacteria; B: β diversity index thermogram of fungus.

2.5 环境因子关联性分析

选取相对丰度前 10 的细菌和前 5 的酵母菌, 用 Pearson 相关性来研究环境因子与物种相对丰度之间的相互变化关系, 得到两两之间的相关性和显著性 P 值。由表 4 可知, 乙酸与 *Lactobacillus* 呈显著性正相关, 与 *Leuconostoc* 呈显著性负相关。这很可能跟 *Lactobacillus* 进行异型乳酸发酵生成乙酸有关。酵母菌与胁迫因子没有显著相关性可能是受酵母菌总数变化较大所影响, 虽然发酵后期物种相

对丰度较高, 但酵母菌总数显著降低。因此有必要将物种的相对丰度与其微生物总数结合起来再进行分析。

2.6 微生物总菌数结合相对丰度分析群落结构变化

如表 5 所示, 分别将总细菌数和总酵母数乘以相对丰度后与胁迫因子进行相关性分析, 另外得知乳酸与 *Issatchenkia*、*Pichia* 呈显著负相关, 总菌数会使相对丰度发生改变。另外, 许多生态过程中环

表 4 胁迫因子与微生物相对丰度 Pearson 相关性分析

Table 4 Pearson correlation analysis of stress factors and microbial relative abundance

物种 Species	Ethanol		Acetic acid		Lactic acid		
	Correlation	Significance	Correlation	Significance	Correlation	Significance	
酵母菌 Yeasts	<i>Issatchenkia</i>	0.163	0.837	0.472	0.527	-0.171	0.828
	<i>Candida</i>	-0.288	0.712	-0.331	0.668	-0.819	0.181
	<i>Pichia</i>	-0.382	0.618	-0.929	0.071	-0.931	0.069
	<i>Saccharomyces</i>	0.489	0.511	-0.397	0.602	-0.330	0.669
	<i>Saccharomycopsis</i>	-0.887	0.113	-0.566	0.434	-0.578	0.421
细菌 Bacteria	<i>Lactobacillus</i>	0.502	0.497	0.956*	0.044	0.908	0.091
	<i>Weissella</i>	-0.680	0.319	-0.934	0.066	-0.866	0.134
	<i>Bacillus</i>	-0.545	0.454	-0.946	0.053	-0.913	0.086
	<i>Cellulosimicrobium</i>	-0.191	0.808	-0.903	0.097	-0.825	0.174
	<i>Citrobacter</i>	0.364	0.635	-0.541	0.458	-0.558	0.441
	<i>Leuconostoc</i>	-0.545	0.454	-0.953*	0.046	-0.906	0.093
	<i>Acetobacter</i>	0.346	0.653	0.668	0.331	0.039	0.960
	<i>Enterobacteriaceae</i>	0.056	0.943	0.217	0.782	0.796	0.203
	<i>Yersinia</i>	0.385	0.614	-0.521	0.478	-0.523	0.477
	<i>Pediococcus</i>	-0.309	0.690	-0.929	0.071	-0.898	0.102

注: *: 显著相关($P \leq 0.05$).

Note: *: Significance at 0.05 level.

表 5 胁迫因子与微生物量 Pearson 相关性分析

Table 5 Pearson correlation analysis of stress factors and microbial biomass

物种 Species	Ethanol		Acetic acid		Lactic acid		
	Correlation	Significance	Correlation	Significance	Correlation	Significance	
酵母 Yeasts	<i>Issatchenkia</i>	-0.421	0.579	-0.643	0.356	-0.955*	0.045
	<i>Candida</i>	-0.550	0.449	-0.623	0.376	-0.895	0.104
	<i>Pichia</i>	-0.477	0.522	-0.914	0.086	-0.951*	0.049
	<i>Saccharomyces</i>	0.419	0.581	-0.491	0.508	-0.534	0.465
	<i>Saccharomycopsis</i>	-0.895	0.104	-0.596	0.403	-0.589	0.410
细菌 Bacteria	<i>Lactobacillus</i>	0.508	0.492	0.961*	0.039	0.902	0.097
	<i>Weissella</i>	-0.655	0.345	-0.942	0.057	-0.875	0.124
	<i>Bacillus</i>	-0.513	0.486	-0.948	0.051	-0.917	0.082
	<i>Cellulosimicrobium</i>	-0.156	0.843	-0.888	0.111	-0.812	0.187
	<i>Citrobacter</i>	0.366	0.633	-0.540	0.459	-0.556	0.443
	<i>Leuconostoc</i>	-0.513	0.486	-0.955*	0.045	-0.909	0.090
	<i>Acetobacter</i>	0.370	0.629	0.682	0.317	0.054	0.945
	<i>Enterobacteriaceae</i>	0.055	0.944	0.218	0.781	0.797	0.202
	<i>Yersinia</i>	0.385	0.614	-0.520	0.479	-0.522	0.477
	<i>Pediococcus</i>	-0.273	0.726	-0.919	0.080	0.890	0.109

注: *: 显著相关($P \leq 0.05$).

Note: *: Significance at 0.05 level.

境的变化对物种相对丰度影响不大, 微生物数量却发生显著变化^[29]。因此, 环境因子关联性分析中同时研究微生物的相对丰度和微生物数量的变化是很有必要的。

整个发酵过程中, 伊萨酵母一直在酵母菌中占绝对优势, 其次是酿酒酵母、假丝酵母、毕赤酵母。Wu 等^[3]也认为伊萨酵母、酿酒酵母、毕赤酵母是芝麻香型白酒发酵过程的主要酵母菌。将主要酵母菌的生物数量和相对丰度排名前 35 的细菌的生物数量进行相关性分析。具有显著相关性的结果如表 6 所示, 除毕赤酵母与乳杆菌呈显著性负相关外, 4 种主要酵母菌与大部分细菌呈正相关。有文献表明, 细菌和真菌共培养时会形成一个特殊的体系, 促进真菌的生长, 促进细菌毒力基因的表达^[30]。由此可知, 白酒发酵过程中, 在胁迫因子的推动下, 微生物之间通过相互制约、相互促进影响群落结构的演替。通过相对丰度结合总菌数进行分析, 可以挖掘更多生

态信息。

3 讨论与结论

不同香型白酒其酿造工艺不同, 不同的酿造工艺和酿造环境赋予了它们不同的微生物群系, 微生物是白酒酿造过程的主力军, 研究发酵过程微生物群落结构的变化对揭示白酒酿造机理, 找到不同香型白酒之间的区别和联系具有重要意义。高通量测序虽然能够全面获得微生物的群落结构, 但不足以反映微生物含量的真实情况, 将高通量测序得到的相对丰度与绝对定量方法得到的微生物数量相结合, 能够更真实地反映不同发酵阶段微生物群落的物种分布^[31]。本文通过高通量测序结合传统平板计数法分析微生物群落及其与胁迫因子相关性, 得到以下结论: (1) 白酒发酵过程中, 在胁迫因子的推动下微生物通过相互制约、相互促进影响着群落结构的演替。(2) 发酵前期, 微生物多样性高, 细菌

表 6 主要酵母菌和细菌 Pearson 相关性分析

Table 6 Pearson correlation analysis of main yeasts and bacterias

物种 Species	<i>Issatchenkia</i>		<i>Saccharomyces</i>		<i>Pichia</i>		<i>Candida</i>	
	Correlation	Significance	Correlation	Significance	Correlation	Significance	Correlation	Significance
<i>Citrobacter</i>	0.268	0.731	0.998**	0.002	0.467	0.532	0.245	0.754
<i>Yersinia</i>	0.228	0.771	0.998**	0.002	0.434	0.565	0.211	0.788
<i>Pseudomonas</i>	0.270	0.729	0.999**	0.000	0.457	0.542	0.231	0.768
<i>Providencia</i>	0.191	0.808	0.997**	0.003	0.402	0.597	0.177	0.822
<i>Luteibacter</i>	0.237	0.762	0.998**	0.002	0.443	0.556	0.221	0.778
<i>Carnimonas</i>	0.386	0.613	0.983*	0.018	0.582	0.417	0.373	0.626
<i>Flexivirga</i>	0.376	0.623	0.985*	0.015	0.572	0.427	0.362	0.637
<i>Vagococcus</i>	0.344	0.655	0.957*	0.043	0.600	0.399	0.411	0.588
<i>Lactobacillus</i>	-0.818	0.182	-0.525	0.474	-0.984*	0.016	-0.934	0.065
<i>Weissella</i>	0.851	0.148	0.338	0.661	0.987*	0.013	0.987*	0.013
<i>Bacillus</i>	0.846	0.153	0.498	0.501	0.992**	0.008	0.947	0.052
<i>Leuconostoc</i>	0.833	0.166	0.505	0.494	0.989*	0.011	0.943	0.056
<i>Kurthia</i>	0.808	0.191	0.526	0.473	0.981*	0.019	0.932	0.067
<i>Streptococcus</i>	0.831	0.168	0.543	0.456	0.986*	0.014	0.928	0.071
<i>Rhodococcus</i>	0.748	0.251	0.587	0.412	0.956*	0.044	0.894	0.105
<i>Sphingobacterium</i>	0.781	0.218	0.675	0.324	0.951*	0.049	0.855	0.144
<i>Enterococcus</i>	0.853	0.146	0.131	0.868	0.946	0.053	0.997**	0.003

注: *: 显著相关($P \leq 0.05$); **: 极显著相关($P \leq 0.01$).

Note: *: Significance at 0.05 level; **: Significance at 0.01 level.

以纤维素菌、魏斯氏菌和芽孢杆菌为主；发酵中后期，乳杆菌数量明显增多，芽孢杆菌次之，两种菌以绝对的数量优势抑制了其他细菌，使微生物多样性降低。整个发酵过程伊萨酵母占酵母菌的绝对优势，其次是酿酒酵母、假丝酵母、毕赤酵母。(3) 本次实验共检测出细菌 279 个 OTU，其中厚壁菌门是最主要的门。共检测出真菌 168 个 OTU，其中子囊菌门是最主要的门。(4) 发酵过程中微生物群落结构的变化与胁迫因子有极显著关系，微生物数量结合相对丰度后，可以挖掘更多的微生物信息，更加全面、准确地揭示白酒发酵过程的生态变化。

白酒的发酵与风味和微生物代谢有着紧密联系，为了更加深入地理解白酒发酵机理，了解群落结构，可以进一步使用 Tax4Fun、PICRUST、FAPROTAX 对生态样本中的微生物群落进行代谢功能预测，找出对白酒风味贡献大的微生物。后期可通过选育这些微生物，提高白酒发酵质量，增强白酒风味品质；另外可通过人为干扰发酵过程生物群落结构控制风味物质的产生，以提高发酵质量。

REFERENCES

- [1] Gao CQ, Yang F, Zhang HS. Advances in microbial flora and flavor components of sesame flavor liquor[J]. Microbiology China, 2017, 44(4): 940-948 (in Chinese)
高传强, 阳飞, 张华山. 芝麻香型白酒微生物菌群及风味物质研究进展[J]. 微生物学通报, 2017, 44(4): 940-948
- [2] Zhou LX, Zhao DY, Lai AG, et al. The technics and style characteristic of Jingzhishenniang liquor[J]. Liquor Making, 2008, 35(3): 27-29 (in Chinese)
周利祥, 赵德义, 来安贵, 等. 景芝神酿酒生产工艺及风格特点[J]. 酿酒, 2008, 35(3): 27-29
- [3] Wu Q, Ling J, Xu Y. Starter culture selection for making Chinese sesame-flavored liquor based on microbial metabolic activity in mixed-culture fermentation[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2014, 80(14): 4450-4459
- [4] Wang HY, Zhang XJ, Zhao LP, et al. Analysis and comparison of the bacterial community in fermented grains during the fermentation for two different styles of Chinese liquor[J]. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, 2008, 35(6): 603-609
- [5] Sha S, Chen S, Qian M, et al. Characterization of the typical potent odorants in Chinese roasted sesame-like flavor type liquor by headspace solid phase microextraction-aroma extract dilution analysis, with special emphasis on sulfur-containing odorants[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2017, 65(1): 123-131
- [6] Sun JY, Zhao DR, Zhang FG, et al. Joint direct injection and GC-MS chemometric approach for chemical profile and sulfur compounds of sesame-flavor Chinese Baijiu (Chinese liquor)[J]. European Food Research & Technology, 2018, 244(1): 145-160
- [7] Wang HY, Zhang XJ, Xu Y, et al. Analysis of the bacterial community in fermented grains of strong aroma style and roasted sesame aroma style liquor[J]. Liquor-Making Science & Technology, 2008(2): 86-89,91 (in Chinese)
王海燕, 张晓君, 徐岩, 等. 浓香型和芝麻香型白酒酒醅中微生物菌群的研究[J]. 酿酒科技, 2008(2): 86-89,91
- [8] Yalcin SK, Ozbas ZY. Effects of pH and temperature on growth and glycerol production kinetics of two indigenous wine strains of *Saccharomyces cerevisiae* from Turkey[J]. Brazilian Journal of Microbiology, 2008, 39(2): 325-332
- [9] Lauber CL, Hamady M, Knight R, et al. Pyrosequencing-based assessment of soil pH as a predictor of soil bacterial community structure at the continental scale[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2009, 75(15): 5111-5120
- [10] Fierer N, Jackson RB. The diversity and biogeography of soil bacterial communities[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2006, 103(3): 626-631
- [11] Bryanskaya AV, Malup TK, Lazareva EV, et al. The role of environmental factors for the composition of microbial communities of saline lakes in the Novosibirsk region (Russia)[J]. BMC Microbiology, 2016, 16(S1): 4
- [12] Langenheder S, Ragnarsson H. The role of environmental and spatial factors for the composition of aquatic bacterial communities[J]. Ecology, 2007, 88(9): 2154-2161
- [13] Wang P, Wu Q, Xu Y. Core microbiota in Chinese liquor fermentation and associations with environmental factors[J]. 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[J]. 微生物学报, 2018, 58(1): 142-153
- [14] Li P, Lin WF, Liu X, et al. Environmental factors affecting microbiota dynamics during traditional solid-state fermentation of Chinese Daqu starter[J]. Frontiers in Microbiology, 2016, 7: 1237
- [15] Hu XL, Du H, Ren C, et al. Illuminating anaerobic microbial community and cooccurrence patterns across a quality gradient in Chinese liquor fermentation pit muds[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2016, 82(8): 2506-2515
- [16] Wu F. Analysis on microbial communities of yeast in Chinese Luzhou-flavor fermentation pits[D]. Chengdu: Master's Thesis of Sichuan University, 2006 (in Chinese)
吴飞. 浓香型白酒窖池发酵过程中酵母类微生物的分析[D]. 成都: 四川大学硕士学位论文, 2006
- [17] Gupta P, Manjula A, Rajendhran J, et al. Comparison of metagenomic DNA extraction methods for soil sediments of high elevation Puga hot spring in Ladakh, India to explore bacterial diversity[J]. Geomicrobiology Journal, 2017, 34(4): 289-299
- [18] Guo JJ, Fu XL, Liao HD, et al. Potential use of bacterial community succession for estimating post-mortem interval as revealed by high-throughput sequencing[J]. Scientific Reports, 2016, 6: 24197
- [19] Geml J, Pastor N, Fernandez L, et al. Large-scale fungal diversity assessment in the Andean Yungas forests reveals strong

- community turnover among forest types along an altitudinal gradient[J]. *Molecular Ecology*, 2014, 23(10): 2452-2472
- [20] Edgar RC, Haas BJ, Clemente JC, et al. UCHIME improves sensitivity and speed of chimera detection[J]. *Bioinformatics*, 2011, 27(16): 2194-2200
- [21] Haas BJ, Gevers D, Earl AM, et al. Chimeric 16S rRNA sequence formation and detection in Sanger and 454-pyrosequenced PCR amplicons[J]. *Genome Research*, 2011, 21(3): 494-504
- [22] Edgar RC. UPARSE: highly accurate OTU sequences from microbial amplicon reads[J]. *Nature Methods*, 2013, 10(10): 996-998
- [23] Wang Q, Garrity GM, Tiedge JM, et al. Naive Bayesian classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2007, 73(16): 5261-5267
- [24] Quast C, Pruesse E, Yilmaz P, et al. The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools[J]. *Nucleic Acids Research*, 2013, 41(D1): D590-D596
- [25] Li ZY, Wang L, Luo YL. Determination of ethanol content in fermented grains by gas chromatography[J]. *Liquor-Making Science & Technology*, 2004(3): 85-86 (in Chinese)
李竹贇, 王莉, 骆雨龙. 气相色谱法测定酒醅中的乙醇[J]. *酿酒科技*, 2004(3): 85-86
- [26] Xiong JY, Li XD, Xie SK, et al. Interaction between lactic acid bacteria and yeasts in light-aroma liquor[J]. *Microbiology China*, 2017, 44(8): 1767-1776 (in Chinese)
熊君燕, 李小东, 谢圣凯, 等. 清香型白酒中乳酸菌和酵母菌的相互作用[J]. *微生物学通报*, 2017, 44(8): 1767-1776
- [27] Mo JX, Wang ZG, Wang CH. Comparison of common microorganism quantity determination methods[J]. *Biology Teaching*, 2012, 37(1): 42-43 (in Chinese)
莫继先, 王志刚, 王昌河. 常见微生物数量测定方法比较[J]. *生物学教学*, 2012, 37(1): 42-43
- [28] Isono N, Hayakawa H, Usami A, et al. A comparative study of ethanol production by *Issatchenkia orientalis* strains under stress conditions[J]. *Journal of Bioscience & Bioengineering*, 2012, 113(1): 76-78
- [29] Berga M, Székely AJ, Langenheder S. Effects of disturbance intensity and frequency on bacterial community composition and function[J]. *PLoS One*, 2012, 7(5): e36959
- [30] Peters BM, Jabra-Rizk MA, Scheper MA, et al. Microbial interactions and differential protein expression in *Staphylococcus aureus-Candida albicans* dual-species biofilms[J]. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 2010, 59(3): 493-503
- [31] Zhang ZJ, Qu YY, Li SZ, et al. Soil bacterial quantification approaches coupling with relative abundances reflecting the changes of taxa[J]. *Scientific Reports*, 2017, 7(1): 4837