

泸型酒发酵酒醅中乳酸菌群落的来源、演替规律及功能预测

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

(1. 江南大学 工业生物技术教育部重点实验室, 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. 国家固态酿造工程技术研究中心, 四川 泸州 646000; 5. 中国科学院 天津工业生物技术研究所, 天津 300308)

摘要: 为明确泸型酒发酵酒醅中乳酸菌的来源、群落演替规律以及潜在功能, 作者利用 16S rRNA 基因高通量测序技术比较了大曲、酒醅和窖泥中的乳酸菌群落结构, 并解析了酒醅乳酸菌在发酵过程中的动态变化, 最后采用 PICRUSt 分析对酒醅微生物群落中乳酸菌的功能进行了预测。高通量测序结果显示, 发酵过程酒醅中存在 49 种乳酸菌, 其中 16 种来源于大曲, 3 种来源于窖泥。酒醅乳酸菌群落结构在发酵的第一周出现剧烈变动, 发酵 2 d 后 *Lactobacillus acetotolerans* 取代 *Weissella confusa* 成为优势微生物并保持至发酵结束。PICRUSt 分析表明, 乳酸菌在酿酒过程中可能主要参与糖酵解途径, 也具有参与丁酸、丙酸等重要香气前体物质代谢的潜力。

关键词: 泸型酒; 酒醅; 乳酸菌; 高通量测序; PICRUSt

中图分类号: TS 201.3 文献标志码: A 文章编号: 1673-1689(2018)12-1242-06

Origin, Succession and Potential Function of Lactic Acid Bacteria in Fermented Grains of Luzhou-Flavor Liquor

LI Lianhui¹, XIAO Chen¹, LU Zhenming^{1,2}, ZHANG Xiaojuan^{1,2},
WANG Songtao⁴, SHEN Caihong⁴, SHI Jinsong³, XU Zhenghong^{*1,2,5}

(1. Key Laboratory of Industrial Biotechnology of Ministry of Education, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 2. National Engineering Laboratory for Cereal Fermentation Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 3. School of Pharmaceutical Science, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 4. National Engineering Research Center of Solid-State Brewing, Luzhou 646000, China; 5. Tianjin Institute of Industrial Biotechnology, Chinese Academy of Sciences, Tianjin 300308, China)

Abstract: To identify the origin, succession and potential function of lactic acid bacteria (LAB)

收稿日期: 2016-01-28

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

* 通信作者: 许正宏(1971—), 男, 江苏泰州人, 工学博士, 教授, 博士研究生导师, 主要从事传统发酵食品酿造机理方面的研究。

E-mail: zhenghuxu@jiangnan.edu.cn

引用本文: 栗连会, 肖辰, 陆震鸣, 等. 泸型酒发酵酒醅中乳酸菌群落的来源、演替规律及功能预测[J]. 食品与生物技术学报, 2018, 37(12): 1242-1247.

during the fermentation process of Luzhou-flavor liquor, we compared the LAB community structures among Daqu, fermented grains, and pit mud using 16S rRNA gene high-throughput sequencing, revealed the succession of LAB community in fermented grains, and predicted the potential function of LAB during fermentation process via PICRUSt technology. Results showed significant differences of LAB community structure among Daqu, fermented grains and pit mud. The structure of LAB community in fermented grains changed dramatically in the first week of fermentation. Furthermore, PICRUSt analysis showed that LAB mainly participated in glycolysis, and possessed the functional potential to generate butanoate and propanoate.

Keywords: Luzhou-flavor liquor, fermented grains, lactic acid bacteria, high-throughput sequencing, PICRUSt

泸型酒是占中国白酒年产量 70% 以上的重要酒种^[1], 产品具有“窖香浓郁, 绵软甘冽, 香味谐调, 尾净余长”的风味特征。泸型酒的生产采用大曲为糖化发酵剂, 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、乳酸菌、芽孢杆菌、己酸菌、丁酸菌、硫酸盐还原菌和古菌在内的多种微生物类群^[2-7]参与了风味物质的合成。

研究表明, 乳酸菌在泸型酒酿造大曲、酒醅、窖泥等生产环境中广泛存在, 是重要的微生物类群^[8-9]。侯小歌^[10]等人从大曲中分离到乳杆菌属、链球菌属、片球菌属和微球菌属共 4 个属 8 种乳酸菌, 刘丽萌^[11]等人从酒醅中分离得到 9 种片球菌, 其中包括酒窖片球菌和耐乙醇片球菌两个新种。张文学^[12]等人通过 PCR-DGGE 技术发现 *Lactobacillus acetotolerans* 在发酵一周后成为酒醅中的优势微生物, 并保持至发酵结束。吴莉莉^[13]等人对酱香型和清香型白酒发酵过程中乳酸菌菌群结构进行了比较, 发现其菌群组成呈现出明显差异。然而, 对于泸型酒酿造过程中酒醅乳酸菌的来源、演替规律及潜在功能目前尚缺少系统研究。

作者采用 16S rRNA 基因高通量测序技术, 分析和比较了大曲、酒醅与窖泥中乳酸菌群落组成差异, 以期明确酒醅中乳酸菌的主要来源; 然后解析了乳酸菌群落在发酵酒醅中的演替规律, 并利用 PICRUSt (Phylogenetic Investigation of Communities by Reconstruction of Unobserved States) 分析对乳酸菌在发酵过程中的潜在功能进行了预测, 为深入探索乳酸菌在白酒酿造过程中的作用与影响提供研究基础。

1 材料与方法

1.1 样品

酒醅、窖泥、大曲样品: 取自四川泸州老窖酿造基地的同一个生产窖池。其中酒醅样品为发酵过程中第 0、1、2、3、7、11、20、30、40 天所取。每天取 3 个平行样充分混合, 取样后迅速置于 -80 °C 保藏。

1.2 试剂与仪器

PowerSoil DNA 提取试剂盒: 美国 MO BIO 公司; 引物: 由上海生工生物工程有限公司合成; Genome Sequencer FLX Titanium system; 瑞士 Roche 公司; NanoDrop 3000: 美国 Thermo Fisher Scientific 公司; 其它分析纯试剂: 购自国药集团。

1.3 DNA 提取

采用 PowerSoil DNA 提取试剂盒提取样品总 DNA, 然后用 NanoDrop 测定其浓度和纯度, 保证每个样品的 DNA 量大于 5 μg, 纯度满足 A_{260}/A_{280} 值在 1.8~2.0 之间。

1.4 细菌 16S rRNA 基因扩增和高通量测序

高通量测序采用针对细菌 16S rRNA 基因 V1-V3 高变区域 (*Escherichia coli* positions 5-534) 的通用引物 P1 (5'-NNNNNNN-TGGAGAGTTTGATCC TGGCTCAG-3') 和 P2 (5'-NNNNNNN-TACCGCGG CTGCTGGCAC-3')^[14], 在每对引物的 5' 末端添加了 18 个不同的碱基序列以区分不同样品扩增得到的序列。PCR 扩增采用 GoTaq Hot Start Polymerase mix (Promega, USA), 具体反应程序如下: 95 °C 预变性 2 min; 94 °C 变性 30 s, 56 °C 退火 25 s, 72 °C 延伸 25 s, 共 25 个循环; 72 °C 延伸 5 min。PCR 产物经过纯化回收并定量后, 使用 GS-FLX Titanium 系统进

行测序,产生平均读长为 400 bp 的序列。

1.5 数据处理与分析

原始序列根据不同的引物标签划分样品,并去除以下不合格的序列^[14]:长度小于 150 bp;平均测序质量的分数小于 35 分;含有不明确的碱基对;含有 8 个以上单聚体或者不含引物的序列,同时采用 UCHIME 去除嵌合体^[15],得到有效的序列文件。

采用 UCLUST 软件 (<http://www.drive5.com/uclust/>) 对所有序列的可操作单元 (operational taxonomic unit, OTU) 划分,阈值设定为 97%。利用 Mothur 软件的 classify.seqs 命令,设定阈值为 80%^[16],采用 Greengenes 数据库得到 OTU 的分类学信息。

1.6 PICRUSt 功能预测

参考 KEGG 数据库,采用 PICRUSt (<http://picrust.github.com/>) 工具对导入的 OTU 分类信息文件进行在线功能预测。

2 结果与分析

2.1 泸型酒发酵过程中乳酸菌相对丰度变化趋势

如图 1 所示,在泸型酒发酵过程中,乳酸菌在总细菌中所占的相对丰度呈现先急剧下降,然后逐渐上升的趋势。在发酵的第 0 天(即入窖当天),乳酸菌的相对丰度大于 50%(51.7%),是酒醅中最主要的微生物类群。封窖 1 d 后乳酸菌的相对丰度急剧下降至 11.2%,说明大量乳酸菌不能适应急剧改变的酒醅环境而消亡。在发酵过程的 1~7 d,酒醅中的乳酸菌快速繁殖,其相对丰度急剧上升;发酵 7 d 之后乳酸菌的相对丰度呈现缓慢上升,在发酵结束时达到 78.8%,为发酵酒醅中的优势微生物。

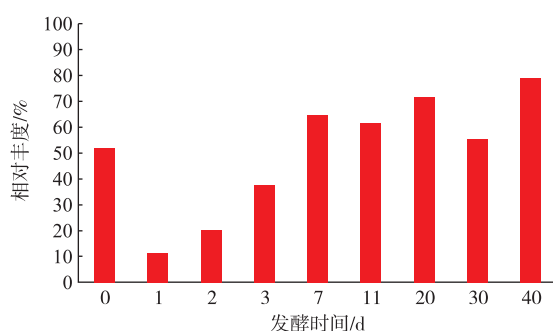


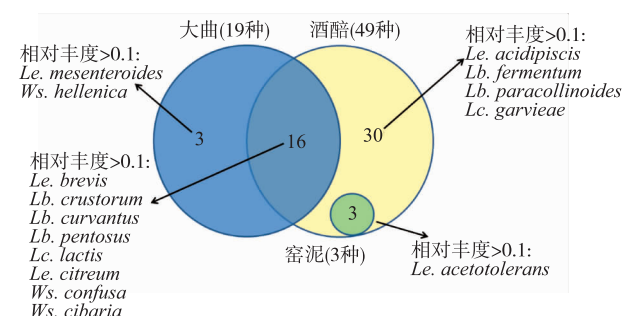
图 1 泸型酒发酵过程中乳酸菌相对丰度变化

Fig. 1 Changes of relative abundance of LAB during the fermentation process of Luzhou-flavor liquor

2.2 大曲、酒醅和窖泥中乳酸菌群落结构比较分析

白酒生产过程中大量的乳酸菌可能来源于生产过程的各个环节,并进入酒醅参与发酵。其中,大曲和窖泥分别作为发酵剂和酿造容器,在窖池内与酒醅直接接触并发生微生物、物质和能量的交换,可能为酒醅提供丰富的微生物来源。因此,我们通过对成熟大曲、酒醅和窖泥的乳酸菌群落中乳酸菌群落结构的比较分析,讨论酒醅中不同乳酸菌的可能来源。

高通量测序结果显示在大曲、酒醅和窖泥中分别检测到 19、49 和 3 种乳酸菌,见图 2。通过比较分析,我们发现 16 种乳酸菌在大曲和酒醅中同时存在,其中有 8 种为酒醅中优势乳酸菌(相对丰度>0.1%),分别是 *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus crustorum*, *Lactobacillus curvatus*, *Lactobacillus pentosus*, *Lactococcus lactis*, *Leuconostoc citreum*, *Weissella confusa* 和 *Weissella cibaria*。同时,窖泥中的 3 种乳酸菌均在酒醅中检测到,其中 *Lactobacillus acetotolerans* 在酒醅中是优势乳酸菌。酒醅中另有 30 种乳酸菌未能在大曲和窖泥中检测到,可能来源于空气等酿造环境,有待进一步研究。



Lb: 乳杆菌属; Lc: 乳球菌属; Le: 明串珠菌属; Ws: 魏斯氏菌属。

图 2 大曲、酒醅与窖泥中的乳酸菌群落比较分析

Fig. 2 Comparison of LAB community among Daqu, fermented grains and pit mud

2.3 发酵过程酒醅中乳酸菌群落演替

如图 3 所示,乳酸菌群落结构在发酵的第一周变化明显,之后趋于稳定。在入窖当天(第 0 天),*Weissella confusa* 是优势乳酸菌,在乳酸菌群落中相对丰度达到 88.0%,但在发酵开始之后其丰度急剧下降,直至在发酵结束时检测不到。*Lactobacillus fermentum* 在第 0 天时其丰度大于 1%,随后逐渐下

降至无法检测。与此相反, *Lactobacillus acetotolerans* 的相对丰度在入窖时小于 1%, 之后开始迅速繁殖, 并在发酵 2 d 后成为酒醅中的优势乳酸菌 (相对丰度 >98%)。另有 8 种乳酸菌的相对丰度在发酵的第 1 天达到最大值, 其分别为 *Lactobacillus brevis* (2.7%), *Lactobacillus crustorum* (14.7%), *Lactobacillus curvatus* (2.7%), *Lactobacillus pentosus* (4.2%), *Lactococcus garvieae* (7.1%), *Leuconostoc citreum* (7.1%), *Pediococcus pentosaceus* (4.2%) 和 *Weissella cibaria* (7.6%); 另有 3 种乳酸菌在发酵的第 2 天达到其最大丰度, 其分别为 *Lactobacillus acidipiscis* (2.2%), *Lactobacillus paracollinoides* (1.8%), *Lactococcus lactis* (2.2%)。在泸型酒发酵过程中, 这些乳酸菌物种不同的变化趋势可能与其来源、生长代谢与环境耐受能力的多样性相关。其中, 封窖之后迅速形成的厌氧发酵环境可能是导致 *Weissella confusa* 快速消亡的原因; *Lactobacillus acetotolerans* 可能由于其较强的耐酸、耐乙醇能力在发酵开始之后迅速成为优势乳酸菌^[12]。

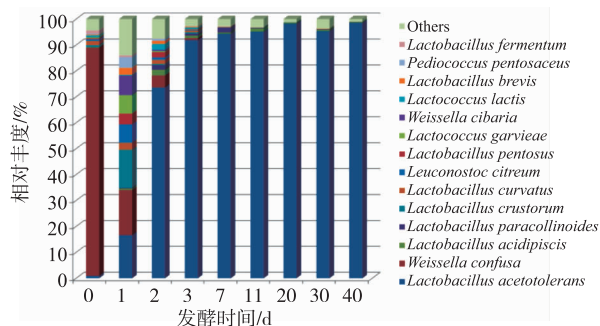


图 3 泸型酒发酵过程中优势乳酸菌种水平演替规律

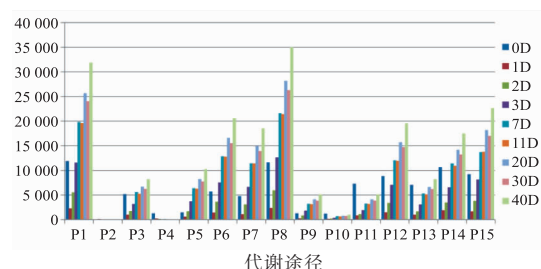
Fig. 3 Dynamics of abundant LAB species during the fermentation process of Luzhou flavor liquor

2.4 乳酸菌群落功能预测

乳酸菌作为酒醅中的优势微生物类群, 解析其在发酵过程中的潜在功能对于解析白酒酿造机理具有重要的意义。作者重点分析了乳酸菌群落在 15 个碳水化合物代谢途径上的分布和演替规律。

如图 4 所示, 乳酸菌在酒醅发酵过程中参与最多的是糖酵解途径, 此外还涉及其它多种糖类的代谢, 包括氨糖与核糖代谢、淀粉和蔗糖代谢、果糖和甘露糖代谢和半乳糖代谢, 然而其很少参与抗坏血酸代谢, 五碳支链酸代谢与磷酸肌醇代谢。同时, 风味物质中与丙酸、丁酸代谢相关的基因在预测的总

基因数中也占有一定比例。从演替规律上看, 大部分代谢途径的预测基因数量呈现先下降后上升的趋势, 这与乳酸菌在总细菌中的相对丰度变化趋势基本一致, 说明其代谢功能与其丰度变化密切相关。而五碳支链酸代谢途径预测基因数量则呈现出一直下降的趋势, 直至完全没有。



P1~P15: KEGG 数据库中关于碳水化合物代谢的 15 个途径; P1: 氨糖与核糖代谢; P2: 抗坏血酸代谢; P3: 丁酸代谢; P4: 五碳支链酸代谢; P5: 三羧酸循环; P6: 果糖和甘露糖代谢; P7: 半乳糖代谢; P8: 糖酵解; P9: 乙醛酸盐代谢; P10: 磷酸肌醇代谢; P11: 戊糖与葡萄糖醛酸转换; P12: 磷酸戊糖途径; P13: 丙酸代谢; P14: 丙酮酸代谢; P15: 淀粉和蔗糖代谢。

图 4 乳酸菌群落在碳水化合物代谢途径的功能预测

Fig. 4 Functional prediction of LAB community in carbohydrate metabolism pathway

3 结语

通过高通量测序技术发现乳酸菌在总细菌中的相对丰度随着发酵时间的推移逐渐上升, 至发酵结束时成为优势微生物。这可能是由于窖池内厌氧、高浓度的有机酸和乙醇等特殊环境不适合大部分微生物的生存, 而乳酸菌属于兼性厌氧菌, 且具有能够耐受较低的 pH 等特性而使其成为优势微生物^[17]。

通过比较泸型酒生产过程中的大曲、酒醅和窖泥的乳酸菌群落结构, 我们发现酒醅中的部分优势乳酸菌可以在大曲和窖泥中检测到。大曲细菌群落以乳酸菌和芽孢杆菌为主体^[18], 其作为糖化发酵剂以 10%~20% 的比例加入酒醅发酵, 可以直接带入大量乳酸菌。在之前的研究中, 郑佳等人^[19]发现 *Lactobacillus acetotolerans* 是窖泥中的优势细菌, 且窖池微生物可以通过酒醅与窖泥的接触面相互迁移。因此, 我们推断酒醅中的部分优势乳酸菌来源于大曲, 而优势乳酸菌 *Lactobacillus acetotolerans* 来源于窖泥。此外, 酒醅中的其它乳酸菌可能来源于原辅料、空气、水甚至操作人员等生产过程涉及的

多种渠道。

通过对发酵酒醅中优势乳酸菌的演替规律分析,我们发现乳酸菌群落结构在发酵第一周剧烈变动,其物种多样性随着发酵时间的推移显著降低。在发酵初期,*Weissella confusa* 占主导地位,然而其很快被 *Lactobacillus acetotolerans* 所取代并一直保持至发酵结束,这与张文学等人的研究结果基本一致^[12]。

此外,作者还采用 PRICUS_t 技术对酒醅中乳酸菌群落进行了碳水化合物代谢相关途径的功能预测,结果显示,乳酸菌参与多种糖类物质的代谢,其中最主要的是糖酵解途径,而在风味物质代谢中主要涉及丁酸、丙酸代谢。通过糖酵解途径葡萄糖被降解为丙酮酸,并在厌氧条件下被还原为乳酸和乙醇,而乳酸正是乳酸菌最主要的代谢产物,这也在

一定程度上解释了乳酸菌更多的参与糖酵解途径的原因。同时,多种乳酸菌也可以通过磷酸戊糖途径进行异型乳酸发酵,但其乳酸合成效率仅为糖酵解途径的一半。丁酸和丙酸是泸型酒中的重要风味物质,被认为主要由梭状芽孢杆菌属、丙酸杆菌代谢产生^[2]。本研究通过功能预测发现乳酸菌也有参与丁酸、丙酸代谢的潜力,而这些物质均是合成泸型酒主体风味物质己酸乙酯的前体物,其是否具有进一步合成己酸乙酯的能力还需要进一步验证。

综上所述,本研究通过比较泸型酒生产过程中大曲、酒醅和窖泥中的乳酸菌群落结构,初步了解了酒醅中部分乳酸菌的来源;同时解析了酒醅乳酸菌群落演替规律,并对乳酸菌群落功能进行了预测,为深入理解乳酸菌在泸型酒酿造中的作用提供了研究基础。

参考文献:

- [1] ZHAO J S, ZHENG J, ZHOU R Q, et al. Microbial community structure of pit mud in a Chinese strong aromatic liquor fermentation pit[J]. **Institute of Brewing & Distilling**, 2012, 118: 356-360.
- [2] HOU Xiaoge, WANG Junying, LI Xuesi, et al. The research progress on functional aroma-producing microorganisms in Zaopei and pit mud of Chinese strong-flavor liquor[J]. **Microbiology China**, 2013, 40(7): 1257-1265. (in Chinese)
- [3] XIONG Ya, CHEN Qiang, TANG Yuming, et al. PCR-DGGE analysis of *Lactobacillus* diversity in pit muds of different cellar-aged Luzhou Laojiao liquor[J]. **Chinese Journal of Applied and Environmental Biology**, 2013, 19(6): 1020-1024. (in Chinese)
- [4] YE Guangbin, LUO Huibo, YANG Xiaodong, et al. Community structure of prokaryotes in pit mud of Lu-flavor liquor from Luzhou prefecture based on culture-independent approach[J]. **Food Science**, 2013, 34(17): 176-181. (in Chinese)
- [5] LEI Guangdian, YAO Wanchun, TANG Yuming, et al. Research on the distribution of important functional microbial communities in Luzhou Laojiao pit mud and their metabolic products[J]. **Liquor-Making Science & Technology**, 2012, 221(11): 54-57. (in Chinese)
- [6] ZHANG Wenxue, QIAO Zongwei, HU Cheng, et al. Analysis of bacterial community in fermented grains during the production of Chinese strong aromatic spirits by PCR technique[J]. **Journal of Sichuan University**, 2005, 37(5): 82-87. (in Chinese)
- [7] LI Ke, FAN Zhigang, WANG Junfang, et al. Microbial diversity in fermented yellow water of traditional intense flavor liquor[J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**, 2015, 34(11): 1155-1161. (in Chinese)
- [8] LI Weiqing. Relationship between Luzhou-flavor liquor, lactic acid bacteria, lactic acid and ethyl lactate[J]. **Liquor Making**, 2010, 37(3): 90-93. (in Chinese)
- [9] SUN Chao, LIU Yong. The distribution of lactic acid bacteria in traditional liquor production and main metabolites[J]. **China Brewing**, 2012, 31(5): 1-4. (in Chinese)
- [10] HOU Xiaoge, DU Xiaobo, LI Xuesi, et al. Isolation & identification of lactic acid bacteria in medium-temperature Daqu and its acid-producing properties[J]. **Liquor-Making Science & Technology**, 2010, 195(9): 17-21. (in Chinese)
- [11] LIU Limeng, ZHANG Bin, DONG Xiuzhu, et al. Separation & identification of *Pediococci* in the fermentation pits for Luzhou-flavor liquor[J]. **Liquor-Making Science & Technology**, 2007, 152(2): 22-25. (in Chinese)
- [12] ZHANG W X, QIAO Z W, SHIGEMATSU T. et al. Analysis of the bacterial community in Zaopei during production of Chinese Luzhou-flavor liquor[J]. **The Institute of Brewing & Distilling**, 2005, 111(2): 215-222.
- [13] WU Lili, WANG Haiyan, XU Yan, et al. Differences of lactic acid bacteria community between soysauce aroma style and light

- aroma style liquor fermentation[J]. **Microbiology China**, 2013, 40(12): 2182-2188. (in Chinese)
- [14] HUANG S, YANG F, ZENG X W, et al. Preliminary characterization of the oral microbiota of Chinese adults with and without gingivitis[J]. **BMC Oral Health**, 2011, 11: 1-14.
- [15] EDGAR RC, HAAS B J, CLEMENTE J C, et al. UCHIME improves sensitivity and speed of chimera detection[J]. **Bioinformatics**, 2011, 27(16): 2194-2200.
- [16] LI Xiaoran, LI Jie, LIU Xiaofeng, et al. Analysis of bacterial community diversity in fermented soybean using pyrosequencing[J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**, 2014, 33(2): 137-142. (in Chinese)
- [17] MOENS F, LEFEBER T, DE VUYST L, et al. Oxidation of metabolites highlights the microbial interactions and role of *Acetobacter pasteurianus* during Cocoa bean fermentation[J]. **Applied and Environmental Microbiology**, 2014, 80(6): 1848-1857.
- [18] ZHANG L Q, WU C D, DING X F, et al. Characterization of microbial communities in Chinese liquor fermentation starters Daqu using nested PCR-DGGE[J]. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, 2014, 30: 3055-3063.
- [19] ZHENG J, LIANG R, ZHANG L Q, et al. Characterization of microbial communities in strong aromatic liquor fermentation pit muds of different ages assessed by combined DGGE and PLFA analyses[J]. **Food Research International**, 2013, 54(1): 660-666.

会 议 消 息

第五届农业和生物科学国际学术会议 (ABS 2019)

大会时间: 2019 年 7 月 22 日-25 日

大会地点: 澳门·澳门科学馆

主办单位: 武汉博胜学术交流有限公司

联系人: 石编辑

电话: 17362961533

Email: abs@absconf.org

大会官网: <http://www.absconf.org/>

会议简介: 从 ABS 2015 年以来, ABS 历届会议广泛邀请来自于世界各地的专家学者与会交流, 探讨农业和生物技术的发展领域的热点、难点和重点问题, 分享该领域最新的研究技术成果。投稿请通过以下会议网站的在线投稿系统:

<http://paper.academicconf.com/author/login.aspx?confname=ABS2019>