



研究报告

氨基酸对青稞酒酿造微生物群落演替及风味代谢的驱动

王宇乔¹ 黄和强² 王石垒¹ 穆晓清^{*1} 李善文² 祁万军² 孔令武² 吴群^{*1}
冯声宝² 徐岩¹

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 酿造微生物学及应用酶学研究中心
江苏 无锡 214122

2 青海互助青稞酒股份有限公司 青海 互助 810500

摘要:【背景】环境因素是微生物生长代谢的重要驱动因素,因此,解析其对白酒酿造过程中微生物群落演替的影响对青稞酒的可控化生产具有重要作用。氨基酸作为微生物生长代谢的重要营养底物以及环境因素,其对微生物群落演替的作用尚不明确。【目的】揭示环境因素对青稞酒发酵过程中微生物群落演替及风味代谢的驱动作用。【方法】通过气相色谱-质谱联用技术对比检测肚里黄和瓦蓝两种青稞原料酿造青稞酒过程中风味物质变化情况;采用高通量扩增子测序及多元统计分析比较两种青稞酒醅中微生物群落结构特征;结合蒙特卡洛置换检验确定环境因素对微生物的影响;通过模拟发酵对以上研究结果进行验证。【结果】肚里黄青稞酒醅中酯类化合物的含量及其发酵后期乳酸杆菌相对丰度和氨基酸含量显著低于瓦蓝酒醅($P<0.05$);通过生物信息学分析发现,环境因素中游离氨基酸是青稞酒发酵过程微生物群落演替重要的推动因素,且乳酸杆菌相对丰度与游离氨基酸呈显著相关;模拟发酵实验证实了特定氨基酸不足会影响乳酸杆菌生长。【结论】揭示了青稞酒发酵过程中游离氨基酸对微生物群落组装的驱动作用,进而影响青稞酒的风味品质,为青稞酒的可控发酵提供理论基础。

关键词: 青稞酒, 高通量测序, 游离氨基酸, 乳酸杆菌

Effects of amino acids on microbial community succession and flavor metabolism in highland barley *Baijiu* fermentation

WANG Yuqiao¹ HUANG Heqiang² WANG Shilei¹ MU Xiaoqing^{*1} LI Shanwen²
QI Wanjun² KONG Lingwu² WU Qun^{*1} FENG Shengbao² XU Yan¹

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

2 Qinghai Huzhu Barley Wine Company Limited, Huzhu, Qinghai 810500, China

Abstract: [Background] Environmental factors are important regulatory factors for the growth and metabolism of microorganisms. Therefore, the analysis of their influence on the succession of microbial

Foundation items: National Key Research and Development Program of China (2018YFD0400402); National Natural Science Foundation of China (31530055)

***Corresponding authors:** E-mail: MU Xiaoqing: xqmu@jiangnan.edu.cn; WU Qun: wuq@jiangnan.edu.cn

Received: 04-03-2020; Accepted: 18-04-2020; Published online: 30-06-2020

基金项目: 国家重点研发计划(2018YFD0400402); 国家自然科学基金(31530055)

***通信作者:** E-mail: 穆晓清: xqmu@jiangnan.edu.cn; 吴群: wuq@jiangnan.edu.cn

收稿日期: 2020-03-04; 接受日期: 2020-04-18; 网络首发日期: 2020-06-30

communities in the fermentation process plays an important role in the controlled fermentation of highland barley *Baijiu*. As important nutrient substrates and environmental factors in microbial growth and metabolism, the effects of amino acids on microbial succession are still unclear. **[Objective]** To revealing the role of environmental factors in driving microbial community succession and flavor metabolism during highland barley *Baijiu* fermentation. **[Methods]** Gas chromatography-mass spectrometry was used to compare the changes of flavors during fermentation of *dulihuang* and *walan* fermented grains. High throughput sequencing and multivariate statistical analysis were used to compare the microbial structure characteristics in two kinds of fermented grains. The effects of environmental factors on microorganisms were determined by Mantel test and correlation analysis. The results were verified by simulated fermentation *in vitro*. **[Results]** The content of esters, amino acids and the relative abundance of *Lactobacillus* in *dulihuang* fermented grains was significantly ($P<0.05$) lower than that in *walan*. Through bioinformatics analysis, it was found that the content of free amino acids drove the microbial succession during the fermentation process, and the relative abundance of *Lactobacillus* was significantly correlated with the content of free amino acids. *In vitro* validation confirmed that the lack of amino acids can affect the growth of *Lactobacillus*. **[Conclusion]** The study revealed the driving effect of free amino acids on the assembly of microbial community in the process of highland barley *Baijiu*, and further affected the flavor quality, laying a foundation for the controlled brewing of highland barley *Baijiu*.

Keywords: highland barley *Baijiu*, high throughput sequencing, free amino acids, *Lactobacillus*

中国白酒酿造采用开放式混菌发酵,微生物的群落结构及其代谢活动是形成白酒风味特征的重要因素之一^[1]。微生物群落结构和代谢受到诸如环境条件等外部因素的强烈影响,包括 pH、水分、温度、底物等^[2-3]。因此,探究环境因素对酿造微生物生长代谢的调控作用,可以为解析白酒微生物酿造机制提供理论依据,并为实现白酒风味可控化生产奠定基础。

目前有大量关于环境因素调控白酒酿造微生物演替的研究。如王鹏等研究发现白酒酿造过程中的化学因素对核心微生物群变化的影响力大于物理因素^[2]。李小龙等发现环境因素对微生物的推动作用是分阶段性的^[4]。Xiao 等研究发现生物热是影响大曲菌群形成的主要驱动力^[5]。发酵底物(如碳源、氮源)作为微生物生长代谢必不可少的因素^[6],其对白酒酿造微生物群落演替的影响还尚不明确。已有研究表明,青稞原料中还原糖(葡萄糖与果糖)对于青稞酒酿造过程中微生物生长及风味代谢具有重要的影响^[7]。然而青稞原料中的其他底物对微生物群落演替的影响尚不清楚。在白酒生产过程

中,原料中的蛋白质经蛋白酶水解生成游离氨基酸供微生物利用。适当的含氮量可以促进微生物生长,增强酶活,促进风味物质生成,提高白酒质量^[8]。因此,氨基酸作为微生物生长繁殖重要的营养物质,对白酒酿造过程中微生物群落结构演替的影响不容忽视。

本研究以青稞酒为载体,探究氨基酸对青稞酒发酵过程中微生物群落结构演替及其风味代谢的影响。结合高通量测序和风味分析以及多元统计分析(相关性分析、蒙特卡洛置换检验),揭示青稞酒发酵酒醅中游离氨基酸含量对酿造过程微生物群落结构演替的推动作用,以及最终对青稞酒的风味品质造成的影响。最后通过缺一法模拟试验进行验证,进一步证明氨基酸在青稞酒酿造过程中的作用,以期解析青稞酒微生物酿造机制奠定理论基础。

1 材料与方法

1.1 酒醅样品

酒醅样品于 2017 年 12 月取自青海互助青稞酒股份有限公司,不同青稞原料(肚里黄,瓦蓝)

酿造过程中的酒醅样本。样品从 6 个不同的窖池 (2.6 m×2.4 m×1.9 m) 中采集得到, 取样深度为 1 m。于发酵的 0、120、240、360、480 和 600 h 取样, 每个时间点包含 2 种原料及 3 个不同窖池的平行样本, 共计 36 份样本。每份样品采集完立即密封, 一式 3 份。一份储存在 4 °C 用于筛菌, 另一份储存在 -20 °C 用于酒醅样品的理化指标检测和物质含量分析, 第 3 份立即在液氮中冷冻, 然后保存于干冰中最后储存在 -80 °C 用于提取 DNA。

1.2 培养基、主要试剂和仪器

MRS 培养基, Oxoid 公司; 化学合成培养基, 参考文献[9]配制。所有试剂均为分析纯, 国药(集团)上海化学试剂有限公司。E.Z.N.A.[®] Soil DNA Kit, Omega Bio-Tek 公司; 细菌基因组 DNA 快速抽提试剂盒、溶菌酶, 生工生物工程(上海)股份有限公司; OPA 试剂, Agilent Technologies 公司。核酸浓度检测仪、厌氧手套箱, Thermo Fisher Scientific 公司; 细胞破碎仪, Biospec Products 公司; 高效液相色谱系统和气相色谱质谱联用, Agilent Technologies 公司; 荧光酶标仪, BioTek 公司。

1.3 酒醅风味成分检测

取 5.0 g 待测样品, 置于 50 mL 离心管中, 加入去离子水 20 mL, 振荡 1 min 混匀, 冰浴超声 30 min (功率 500 W), 再振荡 1 min, 8 000 r/min 离心 5 min, 取 8 mL 上清液和 20 μ L 薄荷醇内标 (69 mg/L) 置于装有 3 g NaCl 的顶空瓶中。挥发性化合物的测定采用气相色谱-质谱联用 (GC-MS; Agilent 6890N 气相色谱仪和 Agilent 5975 质谱检测器), 色谱柱为 DB-FFAP (60 m×0.25 mm×0.25 μ m; Agilent), 检测条件参考文献[10]。

1.4 酒醅 DNA 提取和高通量测序

准确称取 7.0 g 酒醅样品, 根据 E.Z.N.A.[®] Soil DNA Kit 的操作说明提取酒醅样品中的 DNA。对于细菌, 对其 16S rRNA 基因的 V3-V4 区域进行扩增, 每个样本 3 个平行。引物为 338F (5'-ACTCCT

ACGGGAGGCAGCAG-3') 和 806R (5'-GACTACH VGGGTWCTAAT-3')。PCR 反应体系: dNTPs (2.5 mmol/L) 2 μ L, 10×Pyrobest Buffer 2.5 μ L, 正、反向引物 (10 μ mol/L) 各 1 μ L, Pyrobest DNA Polymerase (2.5 U/ μ L) 0.4 μ L, 模板 DNA 15 ng, ddH₂O 补足到 25 μ L。PCR 反应条件: 95 °C 5 min; 95 °C 30 s, 55 °C 30 s, 72 °C 40 s, 共 25 个循环; 72 °C 10 min。对于真菌, 对其 ITS2 区域进行扩增, 每个样本 3 个平行。引物为 ITS3 (5'-GCATCGATG AAGAACGCAGC-3') 和 ITS4 (5'-GCATCGATGAA GAACGCAGC-3')。PCR 反应体系同细菌, 反应条件: 95 °C 2 min; 95 °C 30 s, 61 °C 30 s, 72 °C 45 s, 共 32 个循环; 72 °C 10 min。PCR 产物的纯化参考文献[11]。纯化后的产物使用 NanoDrop ND-1000 UV-Vis 进行定量, 后将同一样本中的 PCR 产物等分子量混合, 并根据 Low Sample Protocol 进行文库制备, 最终在 Illumina MiSeq 测序平台上测序。将测序的原始数据提交至 DDBJ (DNA Data Bank of Japan) 数据库, 编号为 DRA009665 和 DRA009666。

1.5 序列处理

使用 QIIME pipeline 对原始数据进行处理。首先进行序列归类, 将标签、引物和接头序列去除, 然后去除长度小于 110 bp、模糊碱基大于 2 bp 和序列平均质量小于 30 分的序列。使用 UCHIME 去除嵌合体。最后利用 UCLUST 把高质量的序列根据 97% 的序列相似度聚成不同的操作分类单元 (Operational Taxonomic Units, OTU), 并计算相应的 Chao1 和 Shannon 指数^[12]。

1.6 酒醅化学指标测定

采用滴定法 (0.1 mol/L 标准氢氧化钠溶液滴定并添加酚酞作为指示剂) 来测定酒醅的酸度。酒醅样品的还原糖含量通过 3,5-二硝基水杨酸 (3,5-Dinitrosalicylic Acid, DNS) 法测定。酒醅酒精度的测定: 取 50 g 酒醅样品和 100 mL 蒸馏水加入 250 mL 烧瓶中, 蒸出馏出液 50 mL, 蒸馏水定容

到 100 mL, 用酒精计测定。

酒醅中的游离氨基酸通过 OPA 柱前衍生反向高效液相色谱-紫外检测法测定, 称取样品 1.0 g 至 25 mL 的容量瓶中, 用 0.5 g/mL 的三氯乙酸溶液定容至刻度线。放置 1 h, 用针头式滤器过滤。取滤液 1 mL 于 1.5 mL 的离心管中, 10 000 r/min 离心 10 min。最后将每个样品取 400 μ L 加入液相小瓶中。采用 Agilent 1100 高效液相色谱系统, 色谱柱为 Agilent Hypersil ODS 柱(5 μ m, 4.0 mm \times 250 mm), 检测条件参考文献[13]。

1.7 数据分析

使用 R 语言中的 Vegan 包, 计算环境因素对微生物群落结构的影响, 并进行蒙特卡洛置换检验。使用 SPSS 23.0 和 Hemi 1.0 分别进行数据标准化和热图绘制。使用 SPSS 23.0 计算酒醅发酵过程中氨基酸和 *Lactobacillus* 的 Spearman 相关性系数 ρ , 并用 Gephi 0.9.2 对 $\rho > 0.6$ 且 $P < 0.05$ 的数据可视化成共现性网络图。

1.8 模拟发酵试验

利用 MRS 培养基对酒醅浸提液进行梯度稀释涂布, 37 $^{\circ}$ C 培养 1–3 d 后, 挑取单菌落于 MRS 液体培养基中进行分离纯化, 并根据细菌基因组 DNA 快速抽提试剂盒的操作说明提取基因组 DNA。用 16S rRNA 基因通用引物 27F (5'-AGAGTTTGAT CCTGGCTCA-3') 和 1492R (5'-GGTTACCTTGTT ACGACTT-3') 进行 PCR 扩增及测序, PCR 反应体系和条件参考文献[14]。将测序结果通过 BLAST 比对完成菌株鉴定, 得到菌株 *L. acetotolerans* B1。

将 *L. acetotolerans* B1 接种至 MRS 液体培养基中, 37 $^{\circ}$ C 静置活化培养 3 d^[14], 然后将培养物于 1 200 \times g 离心 10 min, 并将细胞沉淀物用无菌水洗涤 3 次, 以减少营养物和代谢产物的残留。将装有化学合成培养基的 96 孔板放到厌氧培养箱中进行脱氧处理 24 h (培养基中的氨基酸及维生素等营养物质采用 0.22 μ m 的无菌滤膜除菌)。化学合成培养基配制采用氨基酸缺一法, 参考文献[15]。然

后在厌氧手套箱中接种并于箱内的恒温培养箱中 37 $^{\circ}$ C 静置培养 3 d, 振荡混匀后使用荧光酶标仪测定其 OD_{600} 值, 一式 9 份。

2 结果与分析

2.1 原料对青稞酒发酵过程中酒醅风味代谢的影响

采用顶空固相微萃取结合气相色谱-质谱的方法, 跟踪检测了瓦蓝与肚里黄青稞酒发酵过程中酒醅的风味物质, 共检测到了 48 种风味物质, 包括 14 种醇类化合物、4 种酸类化合物、21 种酯类化合物、3 种醛类化合物、1 种酮类化合物、3 种酚类化合物和 2 种吡嗪类化合物。根据风味物质的含量可将发酵分为 2 个阶段, 即风味物质相对较少的发酵前期(0–240 h)和大量累积的发酵后期(360–600 h), 发现 360–600 h 是白酒发酵风味物质的高产期。如图 1 所示, 瓦蓝青稞酒醅中的大量酯类化合物含量显著高于肚里黄青稞酒醅, 而肚里黄青稞酒醅中仅有少量酯类物质和醇类物质含量显著高于瓦蓝青稞酒醅($P < 0.05$)。

2.2 青稞酒发酵过程中微生物群落结构演替

2.2.1 微生物的物种多样性

通过 Illumina MiSeq 测序来揭示不同青稞原料发酵过程中微生物群落多样性和组成。36 个样本的覆盖率均 $>99\%$, 表明两种青稞原料发酵过程的测序数据深度和质量都符合要求(表 1)。Chao1 指数代表菌种丰富度, 用来评估群落中的 OTU 数目。Shannon 指数可以解释物种分布均匀度^[16]。对于细菌群落的 α 多样性, 瓦蓝青稞酒醅中的 Chao1 指数显著高于($P < 0.05$)肚里黄青稞酒醅, 在 360 h 时达到最大值 245.3。Shannon 指数没有显著性差异, 但肚里黄和瓦蓝青稞酒醅分别在 240 h 和 120 h 时达到最高。肚里黄青稞酒醅的 OTU 为 78–107 个, 瓦蓝青稞酒醅的 OTU 为 105–160 个, 瓦蓝酒醅的 OTU 数量显著高于($P < 0.05$)肚里黄酒醅。对于真菌群落的 α 多样性, 瓦蓝青稞酒醅中的 Chao1 指数显著高于($P < 0.05$)肚里黄青稞酒醅, 在 360 h 时达

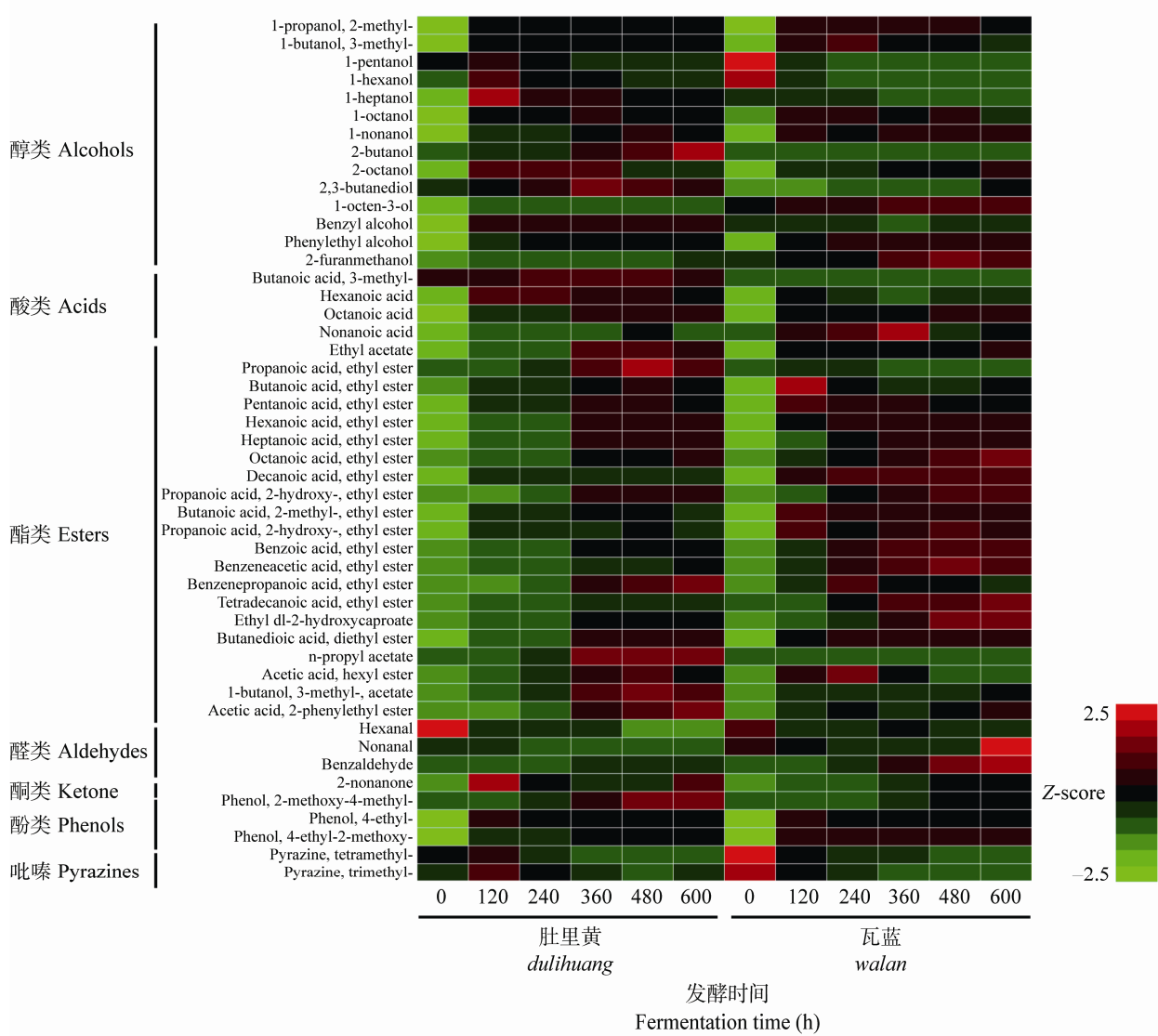


图 1 瓦蓝与肚里黄青稞发酵过程中风味物质变化热图
Figure 1 Heat map of flavors in fermented grains *dulihuang* and *walan* during fermentation

表 1 各样本 Illumina 测序的统计信息

青稞品种 Types	时间 Time (h)	16S rRNA gene					rDNA ITS				
		Chao1	Coverage (%)	Shannon	OTUs	Reads	Chao1	Coverage (%)	Shannon	OTUs	Reads
肚里黄 <i>dulihuang</i>	0	132.1	99.83	2.84	107	43 148	64.9	99.92	2.31	56	22 372
	120	115.8	99.84	3.35	92	65 898	69.5	99.91	1.88	51	59 965
	240	115.5	99.84	3.78	97	47 711	52.1	99.94	1.91	43	46 139
	360	110.2	99.85	3.42	86	47 463	66.5	99.95	2.48	57	37 300
	480	98.8	99.87	3.56	78	48 378	61.5	99.96	2.94	54	28 551
	600	98.6	99.87	3.33	83	48 185	73.5	99.91	2.46	56	61 029
瓦蓝 <i>walan</i>	0	183.0	99.74	2.63	117	61 926	75.3	99.93	2.19	56	22 372
	120	122.9	99.84	4.05	105	76 308	88.0	99.91	2.18	51	59 965
	240	139.0	99.80	3.99	105	67 530	74.6	99.94	2.33	43	46 139
	360	245.3	99.57	2.37	160	39 469	73.2	99.93	2.55	57	37 300
	480	187.5	99.68	1.91	119	43 635	65.4	99.94	2.31	54	28 551
	600	179.7	99.68	2.22	132	51 275	74.3	99.92	2.09	56	61 029

到最大值2.55。Shannon指数没有显著性差异,肚里黄和瓦蓝青稞酒醅分别于480 h和360 h达到最大值,两者之间的OTU数量没有显著差异。

2.2.2 微生物的群落结构组成及动态变化

为探究2种青稞酒风味品质差异的形成原因,通过Illumina MiSeq测序揭示肚里黄与瓦蓝青稞酒醅发酵过程中微生物群落结构的组成(相对丰度>1%) (图2)。对于真菌群落, *Saccharomycopsis* (23.33%–65.74%)、*Saccharomyces* (1.90%–45.34%) 和 *Pichia* (12.23%–48.78%) 3个属在整个青稞酒发酵过程中占主导地位。对于细菌群落, *Pantoea* 在发酵0 d时占主导地位(>40%), 而发酵后期(360–600 h)由 *Lactobacillus* 占主导地位(>60%)。但

对于肚里黄青稞酒醅,发酵到360 h时 *Lactobacillus* 相对丰度为56.38%,其相对丰度在发酵末期达到最大值,为70.99%;而瓦蓝青稞在发酵360 h时 *Lactobacillus* 相对丰度已占74.37%,发酵末期达到了80.72%。说明在肚里黄青稞酒醅中, *Lactobacillus* 在发酵后期的相对丰度较低。

为了揭示微生物对2种青稞酒醅风味差异的影响,选取19个优势微生物属(11个真菌属和8个细菌属,相对丰度>1%),计算其与49种风味物质之间的Spearman相关系数,选取 $\rho>0.6$ 作为有效网络连接进行绘图(图3)。结果表明 *Lactobacillus* 是连接数最多的属(24),与13种酯类、2种酸类、2种醇类和7种芳香类风味物质之间存在显著的关

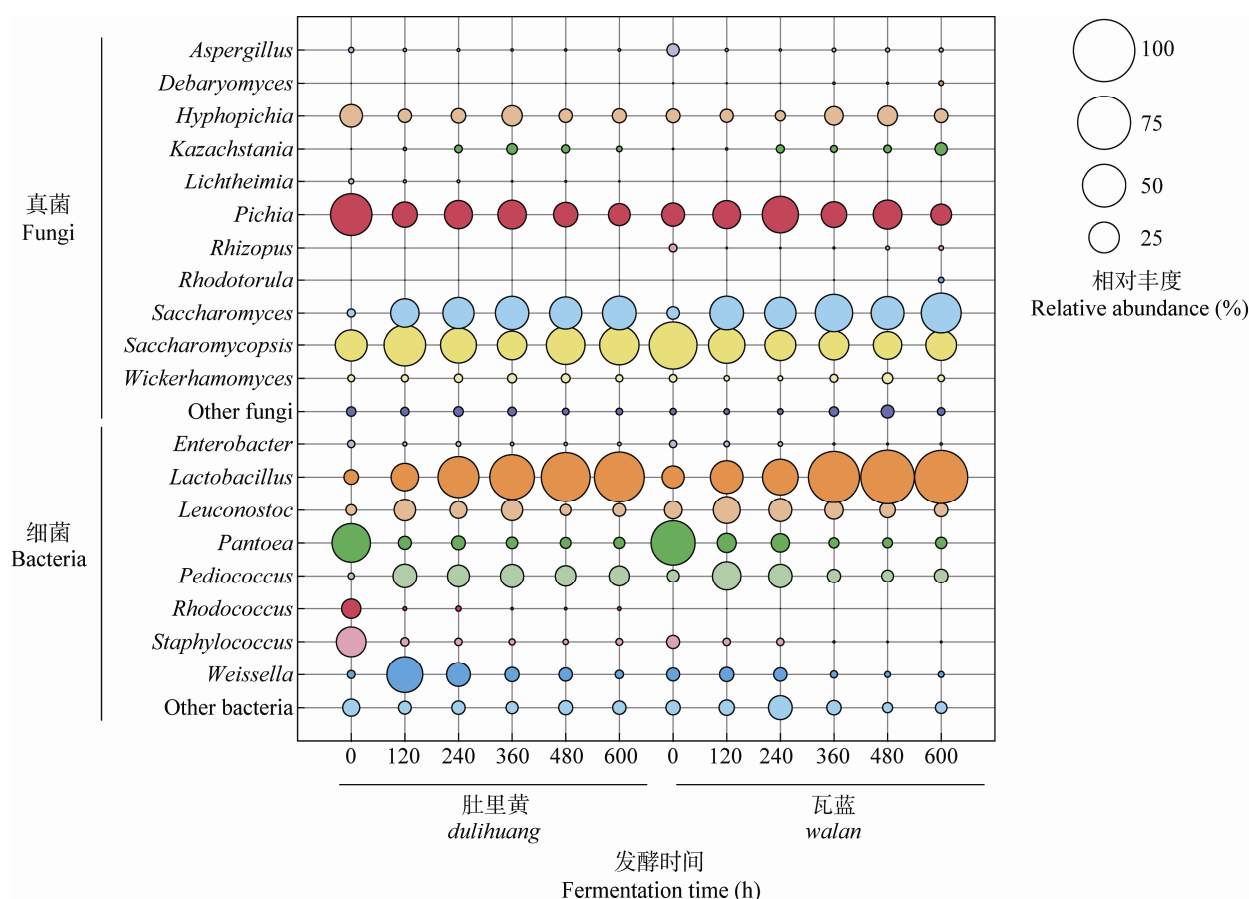


图2 肚里黄和瓦蓝青稞酒发酵酒醅中微生物群落结构在属水平的动态分布

Figure 2 The dynamics of the relative abundance of fungal taxa and bacterial taxa represents at the genus level during highland barley *Baijiu* fermentation (*dulihuang* and *walan*)

Note: "Other" represents the genera with relative abundance <1%

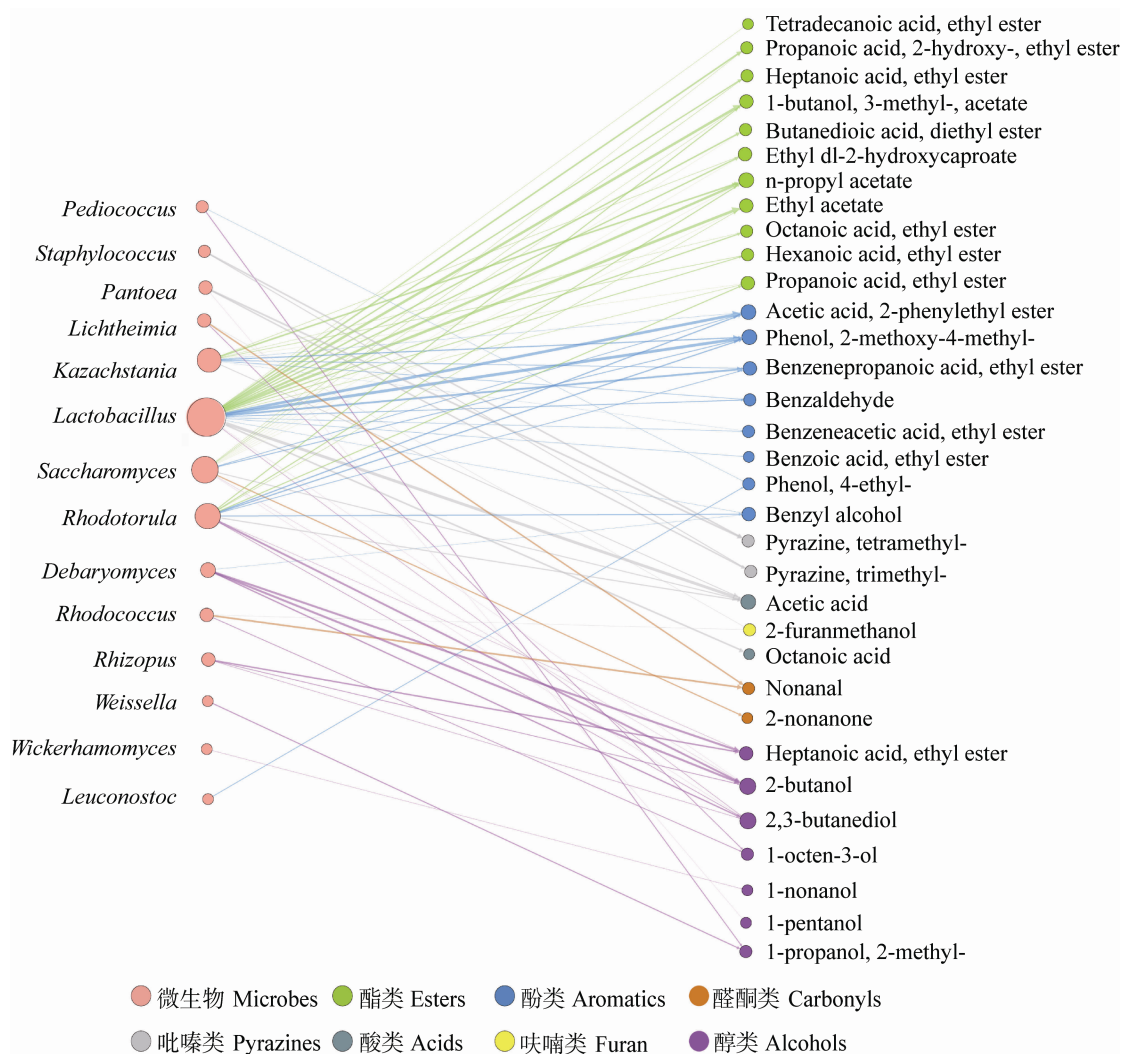


图3 肚里黄和瓦蓝青稞酒发酵酒醅中微生物属与风味物质相关性分析

Figure 3 Correlation network between microbial genera and aroma compounds during highland barley *Baijiu* fermentation (*dulihuang* and *walan*)

联,其中乙酸乙酯、2-羟基己酸乙酯、肉豆蔻酸乙酯、丁二酸二乙酯、辛酸乙酯、癸酸乙酯、己酸乙酯和乳酸乙酯在瓦蓝青稞酒醅中的含量显著高于肚里黄青稞酒醅($P<0.05$)。结果表明,肚里黄酒醅中风味物质含量较低可能与 *Lactobacillus* 相对丰度较低有关。

2.3 影响微生物群落结构演替的环境因素

为了探究引起2种发酵酒醅中微生物群落结构差异的原因,跟踪检测了酒醅发酵过程中一些可能会影响微生物生长代谢的环境因素,包括游离氨

基酸、还原糖、酒精度及酸度。如图4所示,从发酵360 h起瓦蓝酒醅中的还原糖与游离氨基酸总量均显著高于肚里黄酒醅;酒精度在发酵360 h以及发酵末期具有显著性差异($P<0.05$),而酸度在发酵240、360 h时有显著差异($P>0.05$)。

为了探究这些因素对微生物群落结构的影响,进行蒙特卡洛置换检验(表2)。结果表明,在发酵第一阶段(0–360 h),4种因素对微生物的群落演替均无推动作用($P>0.05$);而在发酵第二阶段(360–600 h),还原糖与微生物群落分布有显著的相

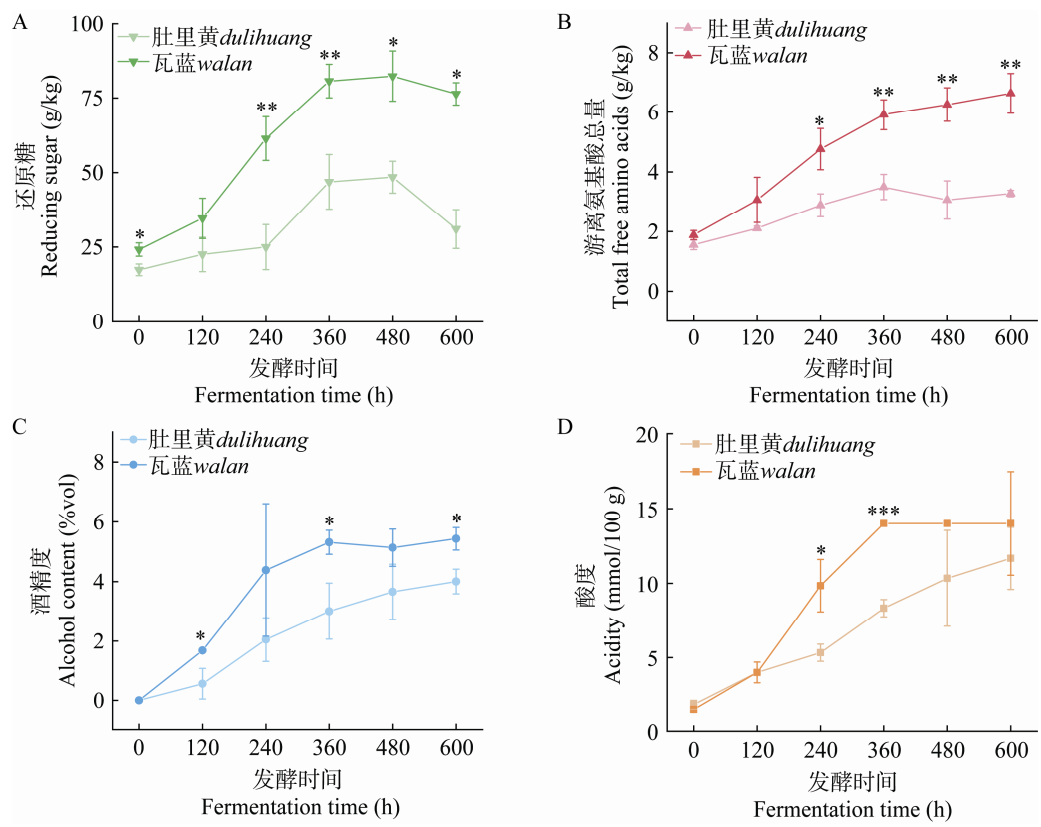


图 4 肚里黄与瓦蓝青稞酒醅发酵过程中还原糖(A)、游离氨基酸(B)、酒精度(C)和酸度(D)的动态变化
Figure 4 Dynamic changes of reducing sugars (A), free amino acids (B), alcoholicity (C), and acidity (D) during highland barley *Baijiu* fermentation
Note: *: $P<0.05$; **: $P<0.01$; ***: $P<0.001$

关性($r^2=0.938\ 7$, $P=0.045\ 8$), 与先前的研究^[7]相符。此外, 酒醅中的游离氨基酸对青稞酒发酵后期(360–600 h)细菌群落的演替也有重要的推动作用($r^2=0.995\ 4$, $P=0.004\ 2$)。

表 2 微生物与环境因素之间的蒙特卡洛置换检验结果
Table 2 Mantel test of microbiota with environmental factors

蒙特卡洛置换检验 Mantel test	阶段 I Phase I		阶段 II Phase II	
	r^2	P	r^2	P
酸度 Acidity (mmol/100 g)	0.591 8	0.275 0	0.795 3	0.108 3
酒精度 Alcohol (%vol)	0.534 8	0.308 3	0.897 6	0.069 4
游离氨基酸总量 Total free amino acids (g/kg)	0.526 7	0.322 2	0.995 4	0.004 2
还原糖 Reducing sugar (g/kg)	0.341 3	0.452 8	0.938 7	0.045 8

2.4 发酵过程中氨基酸组成及含量演变

为了探究青稞酒发酵过程酒醅中游离氨基酸如何对微生物群落结构演替造成影响, 使用 HPLC 跟踪测定了发酵过程中 17 种氨基酸含量的变化趋势。基于相对含量标准化(Z-Score) Heatmap (图 5) 可以发现, 从发酵 120 h 起, 瓦蓝青稞酒醅中 17 种游离氨基酸的含量远高于肚里黄青稞酒醅, 而且肚里黄青稞酒醅中组氨酸、精氨酸、酪氨酸的含量在发酵 360 h 后有所减少。

为了解释酒醅中游离氨基酸对 *Lactobacillus* 的影响, 计算了游离氨基酸含量与 *Lactobacillus* 相对丰度之间的 Spearman 相关系数(ρ), 选取 $\rho>0.6$ 且具有显著性($P<0.05$)关联的连接来绘制相关性网络图(图 6)。结果表明, *Lactobacillus* 与 14 种氨

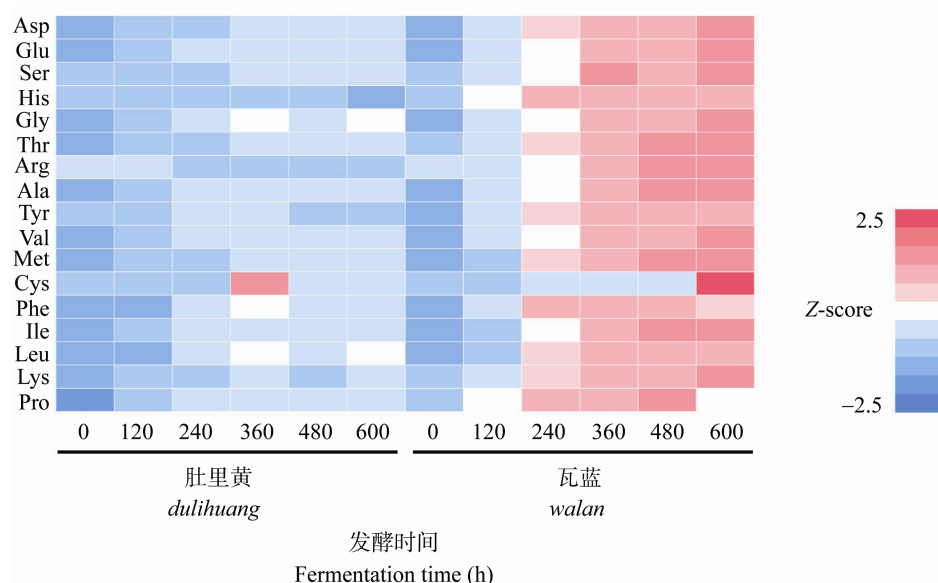


图5 发酵过程酒醅中游离氨基酸含量变化 heatmap

Figure 5 Heatmap of change in free amino acids during the fermentation process

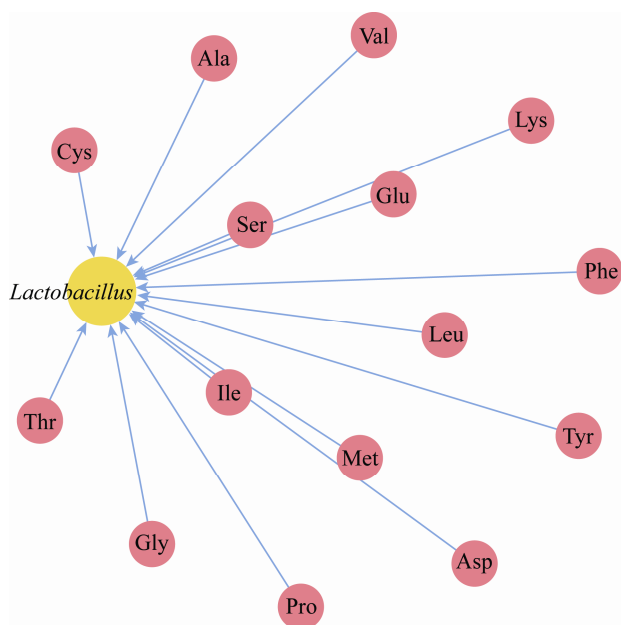


图6 发酵过程酒醅中 *Lactobacillus* 与游离氨基酸的相关性网络图

Figure 6 Correlation network between *Lactobacillus* and free amino acids

注：相关性关系是基于 Spearman 相关系数计算获得的，黄色节点代表 *Lactobacillus*，红色节点代表氨基酸。连线的粗细与相关性系数呈正比

Note: The correlation relationship is calculated based on the Spearman correlation coefficient. The yellow nodes represent *Lactobacillus* and the red nodes represent amino acids. The thickness of the connection is proportional to the value of Spearman's correlation

氨基酸呈显著正相关($P < 0.05$, $\rho > 0.6$), 说明发酵酒醅中的游离氨基酸含量对 *Lactobacillus* 的相对丰度具有重要影响。因此, 肚里黄青稞酒醅中游离氨基酸含量较少可能是其发酵后期 *Lactobacillus* 相对丰度较低的原因。

2.5 氨基酸对 *Lactobacillus* 生长的影响

为了验证氨基酸对 *Lactobacillus* 生长的影响, 利用氨基酸缺一法在体外探究了对 *L. acetotolerans* B1 的 OD_{600} 值具有显著影响的氨基酸。其中, *L. acetotolerans* 是白酒发酵过程中起重要作用的微生物, 也是白酒发酵后期含量最高的 *Lactobacillus*^[3,7,17-18]。结果表明, 在培养基中缺乏组氨酸、异亮氨酸和亮氨酸等 11 种氨基酸时, *L. acetotolerans* B1 的 OD_{600} 值显著低于($P < 0.05$)所有氨基酸均存在时的 OD_{600} 值, 而其余 5 种氨基酸的缺乏不会对 *L. acetotolerans* B1 的 OD_{600} 值造成显著影响($P > 0.05$) (图 7)。说明当发酵底物中有 11 种氨基酸的缺乏或含量不足时会导致 *L. acetotolerans* B1 的 OD_{600} 值降低。结合原位体系中 *Lactobacillus* 与游离氨基酸之间的相关性分析表明, 肚里黄酒醅中异亮氨酸、亮氨酸、甲硫氨酸、脯氨酸、半胱氨

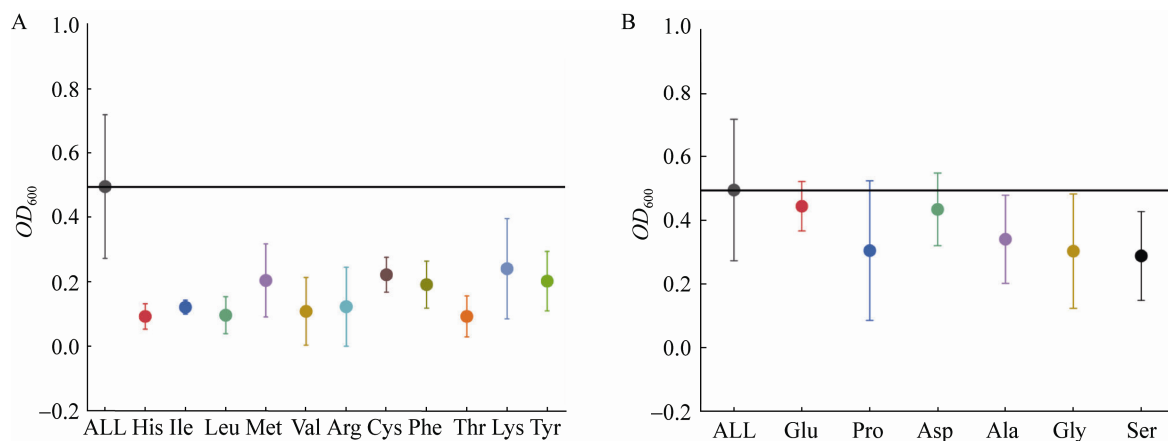


图7 对 *Lactobacillus* 有显著影响的氨基酸(A)及无显著影响的氨基酸(B)

Figure 7 Amino acids have significant effects (A) and that have no significant effect (B) on *Lactobacillus*

注: ALL: *L. acetotolerans* B1 在完全化学合成培养基中生长的 OD₆₀₀ 值

Note: ALL: OD₆₀₀ value of *L. acetotolerans* B1 grown in complete chemical synthesis medium

酸、苏氨酸、赖氨酸和酪氨酸含量的不足导致了其发酵后期 *Lactobacillus* 相对丰度较低。

3 讨论与结论

环境因素对青稞酒发酵有至关重要的推动作用,碳源与氮源作为微生物生长代谢重要的营养物质,很少见到关于其对微生物群落演替推动作用的报道。本团队之前的研究发现,还原糖可作为青稞酒发酵过程中微生物群落结构演替的重要驱动力,尤其是葡萄糖与果糖^[7]。在这项研究中,我们通过高通量测序和蒙特卡洛置换检验进一步发现,青稞酒醅中的游离氨基酸对微生物的结构与演替具有驱动作用。

氨基酸对微生物的生长及代谢具有至关重要的作用,最近关于肠道微生物的研究表明,氨基酸在肠道中经微生物分解代谢会产生短链脂肪酸、含硫化合物、芳香族化合物、多胺、氨等物质,这些氨基酸代谢物可能会对宿主细胞和组织产生有益或有害的生理影响^[19-20]。另外,氨基酸还可以作为微生物之间交叉喂养的代谢物来调控微生物之间的相互作用,进而影响体系中的微生物群落组装,如肠道中 *Faecalibacterium prausnitzii* 可为

Lactobacillus paracasei 与 *Bacteroides vulgatus* 提供其生长必需的精氨酸^[21]。同时, *Lactobacillus* 是许多发酵食品中的功能核心微生物,已有研究表明 *Lactobacillus* 在奶酪、葡萄酒、黄酒、泡菜以及白酒中都发挥重要的作用,能产生酸类、酯类等风味化合物,并且和其他微生物之间产生复杂的相互作用来影响微生物的群落组装^[22-26]。然而 *Lactobacillus* 多为氨基酸营养缺陷型且具有种间特异性,环境中缺乏其必需氨基酸会抑制其生长,如 *Lactobacillus buchneri* 在缺乏缬氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、精氨酸、脯氨酸等氨基酸时无法生长^[15]。我们的研究发现, *L. acetotolerans* 作为白酒酿造系统也是青稞酒酿造过程中重要的微生物^[3,7,17-18], 组氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、甲硫氨酸、脯氨酸、精氨酸、半胱氨酸、苯丙氨酸、苏氨酸、赖氨酸和酪氨酸的缺失会影响其生长代谢。在青稞酒酿造系统中, *L. acetotolerans* 的相对丰度较低会影响其风味品质,如肚里黄酒醅中乙酸乙酯、2-羟基己酸乙酯、肉豆蔻酸乙酯、丁二酸二乙酯、辛酸乙酯、癸酸乙酯、己酸乙酯和乳酸乙酯等酯类物质含量低于瓦蓝酒醅,而酯类具有水果味、花香和甜香等风味^[9], 酯类的不足不利于青稞酒品质。

本研究通过高通量测序结合多元统计分析,揭示了游离氨基酸对青稞酒醅酿造过程微生物群落演替以及风味代谢的驱动作用,通过相关性分析发现了 *Lactobacillus* 与氨基酸之间的显著关联,进而通过验证试验揭示了其中一株重要的乳酸菌 *L. acetotolerans* 的氨基酸缺陷型,这对于解析白酒酿造微生物演替驱动力、提升白酒品质具有重要意义。

REFERENCES

- [1] Jin GY, Zhu Y, Xu Y. Mystery behind Chinese liquor fermentation[J]. Trends in Food Science & Technology, 2017, 63: 18-28
- [2] 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
- [3] Wang SL, Wu Q, Nie Y, Wu JF, Xu Y. Construction of synthetic microbiota for reproducible flavor compound metabolism in Chinese light-aroma-type liquor produced by solid-state fermentation[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2019, 85(10): e03090-18
- [4] Li XL, Wu Q, Xu Y. Synergism between ethanol and acidity drives microbial community succession during roasted sesame-flavor liquor solid-state fermentation[J]. Microbiology China, 2019, 46(1): 1-10 (in Chinese)
李小龙, 吴群, 徐岩. 乙醇与酸度协同作用推动芝麻香型白酒固态发酵过程的微生物群落演替[J]. 微生物学通报, 2019, 46(1): 1-10
- [5] Xiao C, Lu ZM, Zhang XJ, Wang ST, Ao L, Shen CH, Shi JS, Xu ZH. Bio-heat is a key environmental driver shaping the microbial community of medium-temperature Daqu[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2017, 83(23): e01550-17
- [6] Korpela K. Diet, microbiota, and metabolic health: trade-off between saccharolytic and proteolytic fermentation[J]. Annual Review of Food Science and Technology, 2018, 9: 65-84
- [7] Liu CC, Feng SB, Wu Q, Huang HQ, Chen ZX, Li SW, Xu Y. Raw material regulates flavor formation via driving microbiota in Chinese liquor fermentation[J]. Frontiers in Microbiology, 2019, 10: 1520
- [8] Cao XL. Correlations of raw materials and liquor-making[J]. Liquor-making Science and Technology, 2002(4): 53-54 (in Chinese)
曹新莉. 原料与酿酒[J]. 酿酒科技, 2002(4): 53-54
- [9] Tramontano M, Andrejev S, Pruteanu M, Klünemann M, Kuhn M, Galardini M, Jouhten P, Zelezniak A, Zeller G, Bork P, et al. Nutritional preferences of human gut bacteria reveal their metabolic idiosyncrasies[J]. Nature Microbiology, 2018, 3(4): 514-522
- [10] Gao WJ, Fan WL, Xu Y. Characterization of the key odorants in light aroma type Chinese liquor by gas chromatography-olfactometry, quantitative measurements, aroma recombination, and omission studies[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2014, 62(25): 5796-5804
- [11] Ren GD, Ren WJ, Teng Y, Li ZG. Evident bacterial community changes but only slight degradation when polluted with pyrene in a red soil[J]. Frontiers in Microbiology, 2015, 6: 22
- [12] Caporaso JG, Kuczynski J, Stombaugh J, Bittinger K, Bushman FD, Costello EK, Fierer N, Peña AG, Goodrich JK, Gordon JI, et al. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data[J]. Nature Methods, 2010, 7(5): 335-336
- [13] Yu DW, Xu YS, Regenstein JM, Xia WS, Yang F, Jiang QX, Wang B. The effects of edible chitosan-based coatings on flavor quality of raw grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*) fillets during refrigerated storage[J]. Food Chemistry, 2018, 242: 412-420
- [14] Du RB. Quantitation analysis and metabolic profiling of lactic acid bacteria in sesame-flavor liquor fermentation[D]. Wuxi: Master's Thesis of Jiangnan University, 2019 (in Chinese)
杜如冰. 芝麻香型白酒酿造过程乳酸菌定量以及代谢特征[D]. 无锡: 江南大学硕士学位论文, 2019
- [15] Terrade N, De Orduña RM. Determination of the essential nutrient requirements of wine-related bacteria from the genera *Oenococcus* and *Lactobacillus*[J]. International Journal of Food Microbiology, 2009, 133(1/2): 8-13
- [16] Schloss PD, Gevers D, Westcott SL. Reducing the effects of PCR amplification and sequencing artifacts on 16S rRNA-based studies[J]. PLoS One, 2011, 6(12): e27310
- [17] Yang XP, Teng KL, Zhang J, Wang FF, Zhang T, Ai GM, Han PJ, Bai FY, Zhong J. Transcriptome responses of *Lactobacillus acetotolerans* F28 to a short and long term ethanol stress[J]. Scientific Reports, 2017, 7(1): 2650
- [18] 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[J]. International Journal of Food Microbiology, 2011, 146(1): 31-37
- [19] Portune KJ, Beaumont M, Davila AM, Tomé D, Blachier F, Sanz Y. Gut microbiota role in dietary protein metabolism and health-related outcomes: the two sides of the coin[J]. Trends in Food Science & Technology, 2016, 57: 213-232
- [20] Oliphant K, Allen-Vercoe E. Macronutrient metabolism by

- the human gut microbiome: major fermentation by-products and their impact on host health[J]. *Microbiome*, 2019, 7(1): 91
- [21] Zengler K, Zaramela LS. The social network of microorganisms-how auxotrophies shape complex communities[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2018, 16(6): 383-390
- [22] Montel MC, Buchin S, Mallet A, Delbes-Paus C, Vuitton DA, Desmasures N, Berthier F. Traditional cheeses: rich and diverse microbiota with associated benefits[J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2014, 177: 136-154
- [23] 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[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2014, 80(19): 6243-6255
- [24] Jiang Y, Xiong XJ, Danska J, Parkinson J. Metatranscriptomic analysis of diverse microbial communities reveals core metabolic pathways and microbiome-specific functionality[J]. *Microbiome*, 2016, 4: 2
- [25] Liu YZ, Rousseaux S, Tourdot-Maréchal R, Sadoudi M, Gougeon R, Schmitt-Kopplin P, Alexandre H. Wine microbiome: a dynamic world of microbial interactions[J]. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 2017, 57(4): 856-873
- [26] Huang ZR, Guo WL, Zhou WB, Li L, Xu JX, Hong JL, Liu HP, Zeng F, Bai WD, Liu B, et al. Microbial communities and volatile metabolites in different traditional fermentation starters used for Hong Qu glutinous rice wine[J]. *Food Research International*, 2019, 121: 593-603

征 稿 简 则

1 刊物简介与刊登内容

《微生物学通报》是由中国科学院微生物研究所和中国微生物学会主办,以微生物学应用基础研究及技术创新与应用为主的综合性学术期刊。本刊为月刊,被中文核心期刊、中国科技核心期刊、CSCD 核心期刊收编,曾获国家优秀科技期刊三等奖,中国科学院优秀科技期刊三等奖,并在新闻出版署设立的“中国期刊方阵”中被列为“双效”期刊。从 2012 年至今,本刊以国内“微生物、病毒学类期刊”综合评价总分第一而蝉联“百种中国杰出学术期刊奖”,而且入选 300 种“中国精品科技期刊”,成为“中国精品科技期刊顶尖学术论文(F5000)”项目来源期刊。

本刊刊登内容包括:工业、海洋、环境、基础、农业、食品、兽医、水生、药物、医学微生物学和微生物蛋白质组学、功能基因组、工程与药物等领域的最新研究成果、产业化新技术和新进展,以及微生物学教学研究改革等。设置的栏目有:研究报告、专论与综述、生物实验室、高校教改纵横、专栏等。

2 投稿方式

投稿时请登录我刊主页 <http://journals.im.ac.cn/wswxtbcn>, 点击作者投稿区,第一次投稿请先注册,获得用户名和密码,然后依照提示提交稿件,详见主页“投稿须知”。

3 写作要求

3.1 来稿要求论点明确,数据可靠,简明通顺,重点突出。

3.2 英文摘要写作注意事项:(1) 建议使用第一人称,以此可区分研究结果是引用文献还是作者所得;(2) 建议用主动语态,被动语态表达拖拉模糊,尽量不用,这样可以避免长句,以求简单清晰;(3) 建议使用过去时态,要求语法正确,句子通顺;(4) 英文摘要的内容应与中文摘要一致,但可比中文摘要更详尽,写完后务必请英文较好且专业知识强的专家审阅定稿后再投稿;(5) 摘要中不要使用缩写语,除非是人人皆知的,如:DNA、ATP 等;(6) 在英文摘要中不要使用中文字体标点符号。

3.3 关键词:应明确、具体,一些模糊、笼统的词语最好不用,如“基因”“表达”等。

3.4 脚注(正文首页下方):

Foundation items:

*Corresponding author: Tel: 86-; E-mail:

Received: 01-01-20xx; Accepted: 01-03-20xx; Published online: 31-03-20xx

基金项目: 基金项目(编号)

*通信作者: Tel: ; E-mail:

收稿日期: 20xx-01-01; 接受日期: 20xx-03-01; 网络首发日期: 20xx-03-31

(下转 p.492)