

研究报告



谷物蛋白对白酒发酵过程中微生物群落及其代谢多样性的调控

王正 王石垒 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与应用酶学研究中心
江苏 无锡 214122

摘要:【背景】在白酒发酵过程中,原料中的谷物蛋白可为微生物的生长提供氮源等营养物质,进而形成多种代谢产物。谷物蛋白可分为清蛋白、球蛋白、醇溶蛋白和谷蛋白。然而,谷物蛋白对微生物多样性及其代谢产物多样性的调控尚不明确。【目的】揭示白酒发酵过程中与微生物多样性及其代谢产物多样性显著相关的关键谷物蛋白种类及其调控作用。【方法】通过 Osborne 法测定不同品种高粱中谷物蛋白的组成;采用多组学联用技术解析 4 种高粱在发酵过程中的微生物菌群多样性及代谢产物多样性;通过模拟发酵揭示原料中影响微生物群落及其代谢多样性的关键蛋白。【结果】4 种高粱中的谷物蛋白组成存在显著差异(ANOSIM: $R=0.85$, $P=0.001$);4 种高粱在发酵第 5 天时, S4 高粱的细菌多样性显著($P<0.05$)高于其他 3 种高粱, S3 高粱中微生物的代谢产物多样性显著($P<0.05$)高于其他 3 种高粱;清蛋白和球蛋白含量与发酵第 5 天的优势细菌多样性($R^2=0.34$, $P<0.05$; $R^2=0.58$, $P<0.05$)和代谢产物多样性呈显著正相关($R^2=0.58$, $P<0.05$; $R^2=0.36$, $P<0.05$),被定义为关键蛋白;模拟发酵实验验证了优势细菌多样性和代谢产物多样性可随着 2 种关键蛋白即清蛋白和球蛋白含量的升高而升高。当清蛋白含量在 3.0 g/L 时,优势细菌多样性及代谢产物多样性可分别达到 0.72 和 0.65;当球蛋白含量在 3.0 g/L 时,优势细菌多样性及代谢产物多样性可分别达到 0.66 和 0.81。【结论】研究揭示了酿造原料中的清蛋白和球蛋白对发酵过程中细菌多样性及代谢产物多样性的调控作用,为提高白酒发酵的可控性及质量提供了依据。

关键词: 白酒发酵, 谷物蛋白, 微生物群落, 代谢多样性, 调控

Regulation of cereal protein on the microbial and metabolic diversity during the Chinese liquor fermentation

WANG Zheng WANG Shilei WU Qun* XU Yan

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

Abstract: [Background] Cereal protein of raw material can provide nutrients such as nitrogen sources for the growth of microbial community, and then form a variety of metabolites during Chinese liquor

Foundation item: National Key Research and Development Program of China (2018YFC1604103)

*Corresponding author: Tel: 86-510-8586411; E-mail: wuq@jiangnan.edu.cn

Received: 08-03-2021; Accepted: 23-03-2021; Published online: 25-04-2021

基金项目: 国家重点研发计划(2018YFC1604103)

*通信作者: Tel: 86-510-8586411; E-mail: wuq@jiangnan.edu.cn

收稿日期: 2021-03-08; 接受日期: 2021-03-23; 网络首发日期: 2021-04-25

fermentation. Cereal protein includes albumin, globulin, kafirin and gluten. However, the regulation of cereal protein on microbial diversity and metabolic diversity is still unclear. **[Objective]** This study aimed to reveal the key cereal protein that are significantly related to microbial diversity, and the effect of their regulation on microbial diversity and metabolic diversity. **[Methods]** The cereal protein was determined by Osborne's method; Identification of microbial diversity and metabolic diversity via HS-SPME-GC-MS and high-throughput sequencing during fermentation with 4 cultivars of sorghum. The key cereal protein was verified by simulated fermentation *in vitro*. **[Results]** The cereal protein of 4 sorghum was significant difference (ANOSIM: $R=0.85$, $P=0.001$); The bacterial diversity of sorghum S4 was significantly higher than others ($P<0.05$) at day 5 of fermentation with 4 sorghum; The metabolic diversity of sorghum S3 was significantly higher than others ($P<0.05$) at day 5 of fermentation with 4 sorghum. The contents of albumin and globulin were significantly correlated with the dominant bacterial diversity ($R^2=0.34$, $P<0.05$; $R^2=0.58$, $P<0.05$) and metabolic diversity ($R^2=0.58$, $P<0.05$; $R^2=0.36$, $P<0.05$) at day 5 of fermentation. Thus, they are defined as the key cereal protein; *In vitro* validation confirmed that the dominant bacterial diversity and metabolic diversity would increase with the increase of albumin and globulin content. When the albumin content is 3.0 g/L, the dominant bacteria diversity and metabolite diversity are 0.72 and 0.65, respectively; when the globulin content is 3.0 g/L, the dominant bacterial diversity and metabolite diversity are 0.66 and 0.81, respectively. **[Conclusion]** The study revealed the regulation of albumin and globulin in raw material on the diversity of bacteria and metabolites, and providing a new perspective for improving the controllability and quality of Chinese liquor fermentation.

Keywords: Chinese liquor fermentation, cereal protein, microbial community, metabolic diversity, regulation

谷物被广泛地运用在食品发酵领域,如白酒的主要原料为高粱、小麦、玉米等^[1-2]。在食品发酵过程中,谷物能够为微生物的生长代谢提供大量的营养物质如碳源、氮源,可以促进微生物的生长、风味物质的代谢、酶活力的提升等^[3-5]。因此,探究谷物成分对食品微生物生长和代谢的调控作用,对了解食品微生物的酿造机制及酿造原料的筛选具有重要作用。

传统发酵食品多采用开放式混菌发酵,微生物常常能够形成高度复杂及多样的微生物群落^[1,6]。现有研究表明微生物多样性在微生物群落的生长代谢中扮演着重要的角色,如 Niccum 等研究表明微生物多样性对微生物群落组装有重要影响^[7]; Johnson 等研究表明微生物多样性与代谢功能存在显著的相关性^[8-9]。因此,在传统发酵过程中,调控微生物多样性对微生物群落结构及其代谢有重要作用。

微生物多样性可受到如温度^[10]、pH^[11]、营养^[12-14]等条件的影响。谷物类为常见的酿造原

料,可为酿造微生物的生长代谢提供大量营养物质。现有研究表明谷物的种类^[12]和品种^[15]均可对微生物群落演替及多样性产生显著影响。原料间的差异可由发酵过程中的底物组成所体现,如底物中糖种类的差异驱动微生物群落演替^[5]及多样性^[16]产生差异;游离氨基酸的差异驱动微生物群落演替及代谢产生差异^[3]等。然而谷物原料中的氮源对微生物及其代谢产物多样性的驱动作用尚不清晰,关键氮源还未明确。因此,有必要研究谷物原料中氮源对微生物群落及其代谢多样性的影响。

本研究以4种不同产区的高粱为研究对象,解析4种高粱中谷物蛋白的组成,重点分析清蛋白、球蛋白、醇溶蛋白和谷蛋白与发酵过程中微生物及其代谢产物多样性的关系。基于扩增子测序技术并结合代谢组学技术,揭示4种高粱发酵过程中与微生物及其代谢产物多样性显著相关的关键蛋白,并通过体外系统验证这些关键蛋白的重要性,以期白酒及其他发酵食品的质量控制提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 高粱样品

4个产区的高粱样品于2018年8月收获, 详细信息见表1。

1.1.2 大曲样品

所有实验均使用同一批次的大曲样品; 大曲样本于2019年6月取自山西某白酒生产企业。

1.1.3 主要试剂和仪器

L-薄荷醇, 北京百灵威科技有限公司; 基因组DNA提取试剂盒(E.Z.N.A.[®] Soil DNA Kit), Omega公司; OPA试剂, 安捷伦公司; 研究中其他试剂均为分析纯, 国药(集团)上海化学试剂有限公司。核酸浓度检测仪和荧光定量PCR仪, 赛默飞世尔科技有限公司; 细胞破碎仪, 上海玉博生物科技有限公司; 液相色谱仪, 安捷伦公司; 气相色谱-质谱联仪, 安捷伦公司; 真空冷冻干燥仪, 艾本德国际贸易有限公司。

1.2 方法

1.2.1 固态发酵实验

于2019年7月进行固态发酵实验及样品收集。参考文献[17]方法, 将每种高粱与水按1:1.25的质量比浸泡过夜, 然后在105℃蒸煮45 min。蒸煮完成且冷却至室温后, 将高粱与大曲以9:1的质量比混合, 然后将混合的高粱(100 g)装入100 mL锥形瓶中, 严格密封, 23.5℃静置发酵28 d, 并设置3个生物学重复。酒醅样品分别于发酵第0、5、10、20、28天时进行收集, 样品采集完立即密封, 用于理化指标检测和物质含量分析的样品保存于-20℃, 用于提取DNA进行扩增子测序的样品保存于-80℃。

1.2.2 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基因组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'-ACTCCTACGGGAGGCAGCAG-3')和806R(5'-GACTACHVGGGTWTCTAAT-3')^[18]。PCR反应体系: dNTPs (2.5 mmol/L) 2 μL, 10×Pyrobest Buffer 2.5 μL, 正、反向引物(10 μmol/L)各1 μL, Pyrobest DNA Polymerase (2.5 U/μL) 0.4 μL, 模板DNA 15 ng, ddH₂O补足25 μL。PCR反应条件: 95℃ 5 min; 95℃ 30 s, 55℃ 30 s, 72℃ 40 s, 25个循环; 72℃ 10 min。对于真菌, 对其rDNA ITS2区域进行扩增, 每个样本3个平行。引物为ITS3(5'-GCATCGATGAAGAACGCAGC-3')和ITS4(5'-GCATCGATGAAGAACGCAGC-3')^[19]。PCR反应体系同细菌。PCR反应条件: 95℃ 2 min; 95℃ 30 s, 61℃ 30 s, 72℃ 45 s, 32个循环; 72℃ 10 min。PCR产物的纯化参考文献[20]。纯化后的产物使用核酸浓度检测仪进行定量, 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^[21]。将测序获得的原始数据提交至DNA Data Bank of Japan (DDBJ)数据库, 编号为DRA011251和DRA011252。

1.2.3 生物量的测定

采用荧光定量PCR (qPCR)技术定量样品中微生物的生物量。反应体系: 2×SG Fast qPCR Master Mix (High Rox) 10 μL, 上、下游引物(20 μmol/L)各0.4 μL, DNA模板(10–50 ng/μL) 1 μL, ddH₂O补足20 μL。细菌及酵母的引物、扩增条件和标准

表1 4种高粱的详细信息

Table 1 The details of 4 cultivars of sorghum

Sorghum ID	Geographical origin	Collection date	Color	Starch (mg/g)	Crude protein (mg/g)	Tannin (mg/g)
S1	Dakota	2018	Yellow	809.53±1.47	84.52±2.58	5.47±0.04
S2	Texas	2018	Yellow	862.03±2.15	90.09±2.10	4.87±0.63
S3	Kansas	2018	Yellow	777.92±5.66	108.61±1.18	5.32±0.43
S4	Texas	2018	Yellow	803.43±9.73	132.24±7.86	5.08±0.14

曲线的构建条件参考文献[22]。

1.2.4 原始序列处理

使用 QIIMEpipeline 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 Unit, OTU),并在 OTU 水平上计算相应的 Simpson 指数^[23]。

1.2.5 高粱谷物蛋白的提取

参照 Osborne 法,将高粱谷物蛋白分为清蛋白、球蛋白、醇溶蛋白和谷蛋白 4 类,利用不同蛋白组分的溶解性差异,分别提取各蛋白组分。取一定的高粱,粉碎后过 40 目筛。取 100.0 g 过筛后的高粱,使用正己烷脱脂后以 1:8 的固液比例添加 ddH₂O,室温连续搅拌 2 h,然后在 4 °C、10 000 r/min 离心 20 min,收集上清液。所得沉淀重复以上操作,合并上清液冷冻干燥即得清蛋白。分别使用 0.5 mol/L NaCl 溶液、70%乙醇和 0.4% NaOH 溶液对沉淀进行提取,得到球蛋白、醇溶蛋白及谷蛋白^[24]。

1.2.6 酒醅理化成分检测

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,冰浴连续超声 30 min (功率为 500 W),再振荡 1 min,8 000×g 离心 5 min,取 8 mL 上清液和 20 μL 薄荷醇内标 (100 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-质谱联仪 (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 μm; Agilent),检测条件参考文献[25]。酒醅的乙醇含量采用液相色谱仪测定^[10]。酒醅的 pH 值参考文献[17]进行测定。

1.2.7 代谢产物多样性计算

代谢产物多样性计算参考文献[26-27]:将各发酵时间下不同代谢产物的含量进行归一化,然后取各发酵时间代谢产物含量归一化后的平均值,即为

代谢产物多样性。

1.2.8 大曲微生物分离

微生物的分离参考文献[28]:称取 10.0 g 大曲,加入 25 mL 的 0.1 mol/L 无菌 PBS 缓冲液,在 300×g 振荡 5 min 后,于 4 °C、300×g 离心 5 min,收集上清,重复洗涤 3 次。然后将收集的上清在 4 °C、5 000×g 下离心 15 min,收集沉淀即为大曲微生物细胞。最后加入 10 mL 无菌 PBS 缓冲液,振荡混匀。

1.2.9 液态验证试验

参考文献[3],采用化学合成培养基,将其中的氮源以清蛋白和球蛋白代替。然后在 48 深孔板中加入 5 mL 培养基和 0.5 mL 上述大曲微生物提取液,于 37 °C 静置培养 3 d,并设置 3 个生物学重复。发酵结束后,将发酵液振荡混匀后进行 DNA 提取及代谢产物检测。

1.2.10 数据分析

通过 OriginPro 9.7.0,对 4 种高粱谷物蛋白组成、微生物多样性和代谢多样性进行主成分分析 (Principal Component Analysis, PCA);通过 R 语言中的 Vegan 包,基于 Bray-Curtis 距离矩阵,使用 ANOSIM (with 999 permutations)确定发酵过程中样品之间的显著差异;通过 SPSS 24.0 进行 ANOVA 分析及代谢产物含量的归一化处理。

2 结果与分析

2.1 不同品种高粱中谷物蛋白的组成

采用 Osborne 蛋白提取法对 4 种高粱中的清蛋白、球蛋白、谷蛋白和醇溶蛋白进行检测,4 种谷物蛋白组成如图 1A 所示。4 种高粱中,S4 谷物蛋白总含量最高,可达 143.12 mg/g;S3 (139.7 mg/g)和 S1 (94.61 mg/g)次之;S2 的谷物蛋白含量最低,为 77.5 mg/g。其中,各高粱中醇溶蛋白的含量最高,范围为 49.65 (S2)–99.11 mg/g (S4);谷蛋白的含量次之,范围为 24.96 (S2)–39.52 mg/g (S4);清蛋白和球蛋白含量较低,清蛋白含量范围为 1.20 (S2)–2.73 mg/g (S4),球蛋白含量范围为 1.71 (S2)–2.30 mg/g (S3)。

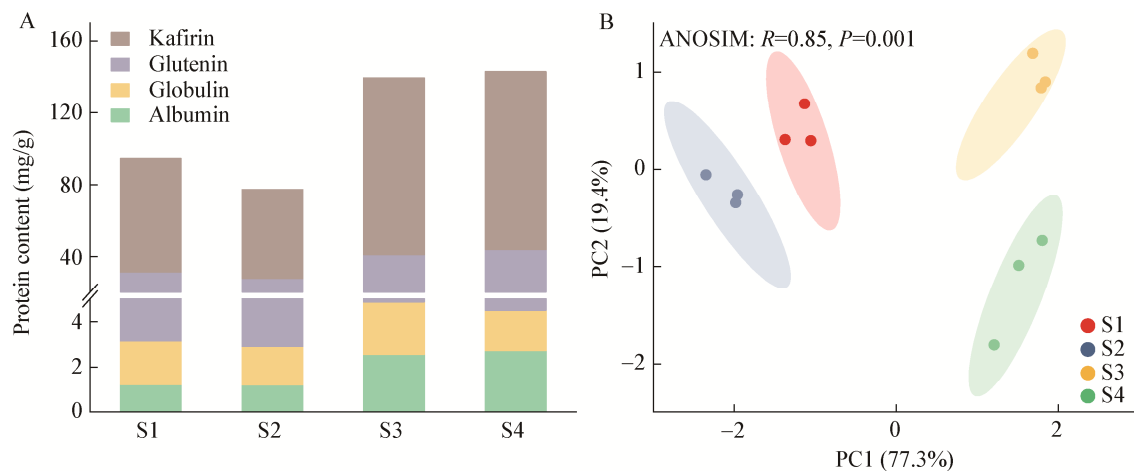


图 1 4 种高粱中谷物蛋白的组成(A)和主成分分析(B) ($n=3$)

Figure 1 The profile (A) and PCA (B) of cereal protein in 4 sorghum ($n=3$)

注: 通过 ANOSIM 确定显著性

Note: Significance determined by ANOSIM

通过主成分分析进一步分析了不同高粱谷物蛋白的组成情况, 如图 1B 所示, 发现 4 种高粱的谷物蛋白组成存在显著性差异(ANOSIM: $R=0.85$, $P=0.001$)。因此推测谷物蛋白的组成差异可能会对发酵过程中微生物多样性及其代谢产物多样性造成影响。

2.2 不同品种高粱发酵过程中微生物多样性

为探究不同蛋白组成对白酒酿造过程中微生物多样性的影响, 在实验室条件下使用 4 种高粱模拟白酒的固态发酵。为确定微生物生长代谢受谷物蛋白影响最大的发酵时间, 跟踪检测了 4 种高粱发酵过程中的细菌生物量、酵母菌生物量、代谢产物含量及 pH 变化, 如图 2 所示。其中, 4 种高粱在发酵第 5 天时, S1、S2 和 S4 的细菌生物量达到最高值; 酵母菌生物量和代谢产物含量趋于平稳; pH 值降至最低, 随后保持稳定。另外, 4 种高粱在发酵第 0–5 天时的细菌生长速率(图 2A)、酵母菌生长速率(图 2B)、代谢产物生成速率(图 2C)和 pH 值的下降速率(图 2D)逐渐降低, 并在第 10 天时降至最低。以上结果表明, 在发酵 0–5 d 时微生物的生长代谢较为强烈, 因此对发酵第 5 天的微生物及代谢多样性进行深入分析。

基于上述结果, 为进一步探究发酵第 5 天的微生物多样性, 通过 Illumina MiSeq 测序揭示发酵第 5 天的微生物群落的组成。对于细菌群落, 共获得 5 020 696 条高质量序列和 1 043 个 OTU。对于真菌群落, 共获得 6 764 350 条高质量序列和 555 个 OTU。每个样品的覆盖率(Coverage)均在 99%以上, 表明测序的深度可以准确反映微生物群落的真实情况。

对于细菌群落, 共有 482 个细菌属, 其中共获得 12 个优势细菌属(相对丰度>1%), 分别为 *Lactobacillus*、*Weissella*、*Pediococcus*、*Bacillus*、*Leuconostoc*、*Stenotrophomonas*、*Staphylococcus*、*Streptomyces*、*Kroppenstedtia*、*Pantoea*、*Lactococcus* 和 *Brevibacterium* (图 3A)。发酵第 5 天的优势细菌多样性通过 Simpson 指数进行表示, 如图 3B 所示。其中, S4 的细菌多样性为 0.596, 显著高于其他 3 种高粱($P<0.05$)。S3 和 S1 的细菌多样性次之, 为 0.553 和 0.548; S2 最低, 为 0.542。

对于真菌群落, 共有 81 个真菌属, 其中共获得 10 个优势真菌属, 分别为 *Pichia*、*Saccharomyces*、*Saccharomycopsis*、*Wickerhamomyces*、*Rhizopus*、*Aspergillus*、*Lichtheimia*、*Geotrichum*、*Hyphopichia*

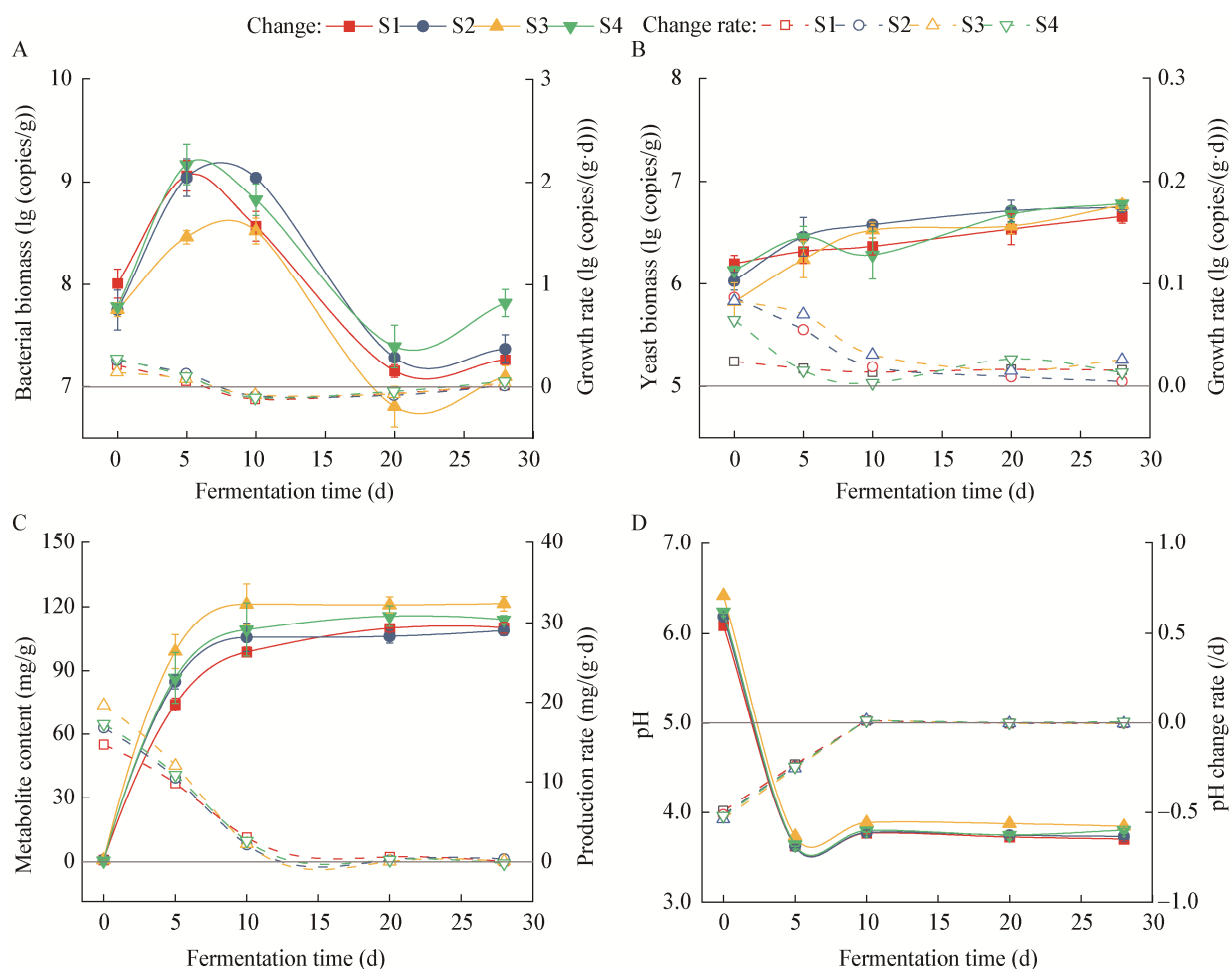


图2 发酵过程中细菌生物量(A)、酵母菌生物量(B)、代谢产物含量(C)和 pH 值(D)的动态变化($n=3$)

Figure 2 Dynamic changes of biomass of bacteria (A), yeast (B), metabolic content (C), and pH (D) during the fermentation ($n=3$)

注: 实线表示生物量(A、B)和代谢产物含量(C)及 pH 值(D); 虚线表示生长速率(A、B)和代谢产物生成速率(C)及 pH 值变化速率(D)
Note: Solid lines represent the biomass (A, B), content of metabolites (C), and pH (D); Dotted lines represent the growth rate (A, B), production rate (C), and pH change rate (D)

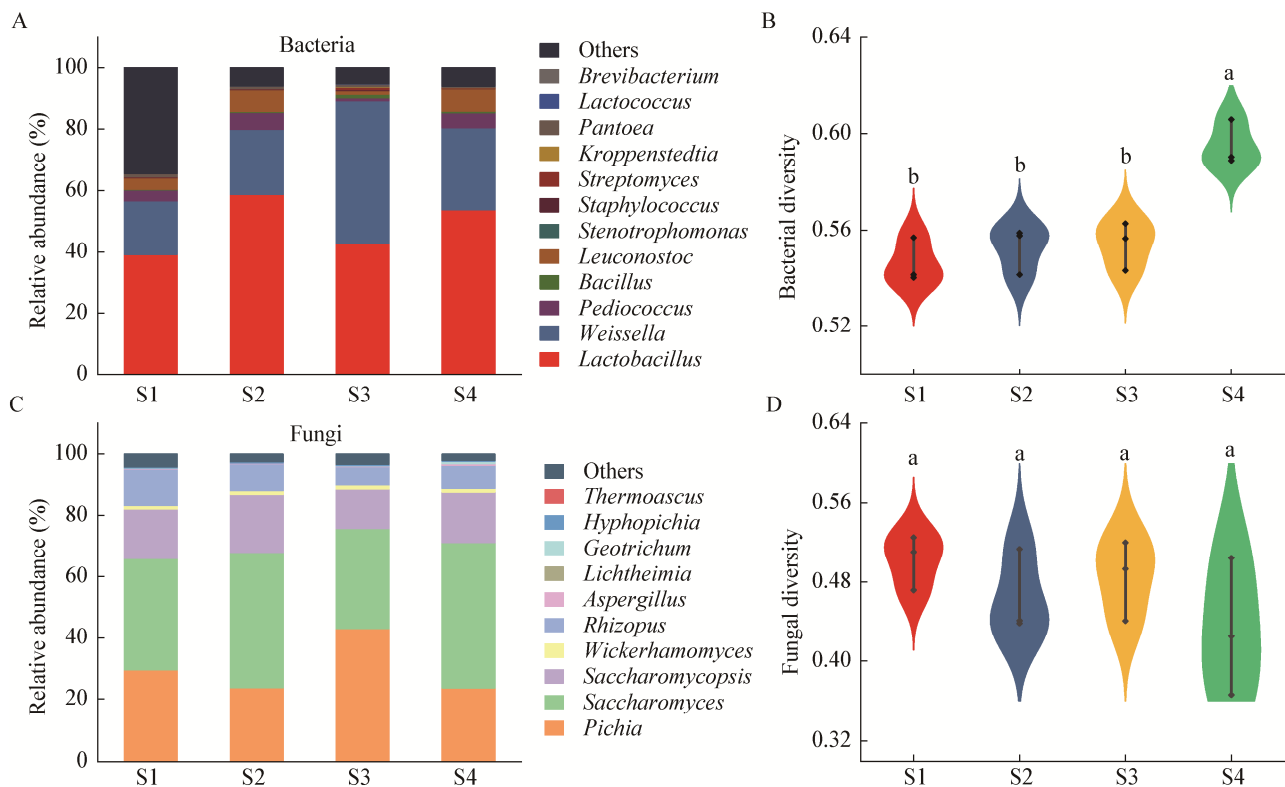
和 *Thermoascus* (图 3C)。发酵第 5 天的优势真菌多样性如图 3D 所示, 4 种高粱的真菌多样性间没有显示出显著性差异, 其中最高的为 S1 (0.502), S3 (0.484)和 S2 (0.464)次之, S4 (0.431)最低。

4 种谷物蛋白组成不同的高粱在发酵第 5 天时, 优势细菌多样性存在显著性差异。为了研究代谢产物多样性的差异, 对发酵第 5 天的代谢产物多样性进行了分析。

2.3 不同品种高粱发酵过程中代谢产物多样性

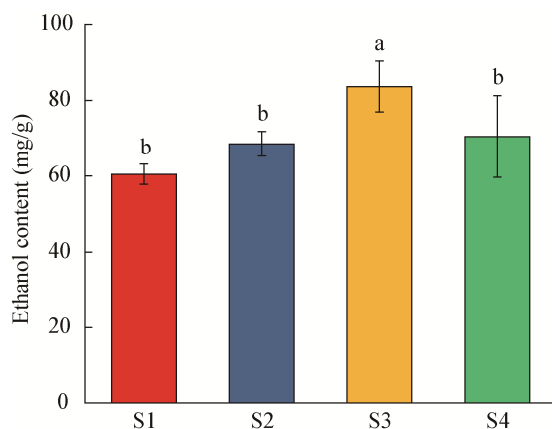
采用 HS-SPME-GC-MS 及 HPLC 分析 4 种高粱在发酵第 5 天时的代谢产物, 共检测到 52 种代谢产

物, 包括 23 种酯类化合物、16 种醇类化合物、5 种酸类化合物、3 种羰基类化合物和 5 种酚类化合物。其中, 16 种代谢产物为优势代谢产物(相对含量>1%) (图 4 和图 5A), 分别为乙醇、乙酸乙酯、3-甲基-1-丁醇、己酸乙酯、乳酸乙酯、1-己醇、辛酸乙酯、癸酸乙酯、丁二酸二乙酯、2,4-二甲基苯甲醛、苯乙醇、苯酚、4-乙基愈创木酚、4-乙基苯酚、4-乙基愈创木酚和棕榈酸乙酯, 如图 5A 所示。S3 的总挥发性代谢产物含量最高, 为 9.17 $\mu\text{g/g}$; 其次为 S4 (8.34 $\mu\text{g/g}$) 和 S2 (8.09 $\mu\text{g/g}$), 最低为 S1 (4.89 $\mu\text{g/g}$)。通过归一化的方法, 计算 4 种高粱在发酵第 5 天的代谢

图3 4种高粱发酵第5天时优势微生物群落组成及多样性($n=3$)Figure 3 Dominant microbial community and microbial diversity at day 5 of fermentation with 4 sorghum ($n=3$)

注: A: 优势细菌群落组成; B: 优势细菌多样性; C: 优势真菌群落组成; D: 优势真菌多样性; 微生物群落组成处于属水平; 微生物多样性处于 OTU 水平; Others 代表平均相对丰度<1%; 上方小写字母表示显著差异($P<0.05$, fisher LSD test)

Note: A: Dominant bacterial community; B: Dominant bacterial diversity; C: Dominant fungal community; D: Dominant fungal diversity; microbial community is at genus level; microbial diversity is at OTU level; Others represents the average relative abundance <1%; lowercase letters above the bars indicate significant differences ($P<0.05$, fisher LSD test)

图4 4种高粱发酵第5天时乙醇含量($n=3$)Figure 4 Ethanol content at day 5 of fermentation with 4 sorghum ($n=3$)

注: 上方小写字母表示显著差异($P<0.05$, fisher LSD test)

Note: Lowercase letters above the bars indicate significant differences ($P<0.05$, fisher LSD test)

产物多样性, 如图 5B 所示。其中, S3 (0.601)的代谢产物多样性显著高于其他 3 种高粱($P<0.05$), S4 (0.468)和 S2 (0.413)的代谢产物多样性显著高于 S1 (0.249) ($P<0.05$)。4 种谷物蛋白组成不同的高粱在第 5 天时的代谢产物存在显著性差异, 对于这种差异是否是谷物蛋白所造成的问题进行了深入分析。

2.4 谷物蛋白与发酵过程中优势微生物多样性及代谢产物多样性的关系

为明确高粱谷物蛋白对发酵过程中微生物多样性及代谢产物多样性的作用, 将 4 种谷物蛋白与微生物多样性及代谢产物多样性进行分析。

清蛋白与优势细菌多样性($R^2=0.34$, $P<0.05$)和代谢产物多样性($R^2=0.58$, $P<0.05$)呈显著正相关, 与优势真菌多样性无显著相关性($P>0.05$) (图 6A);

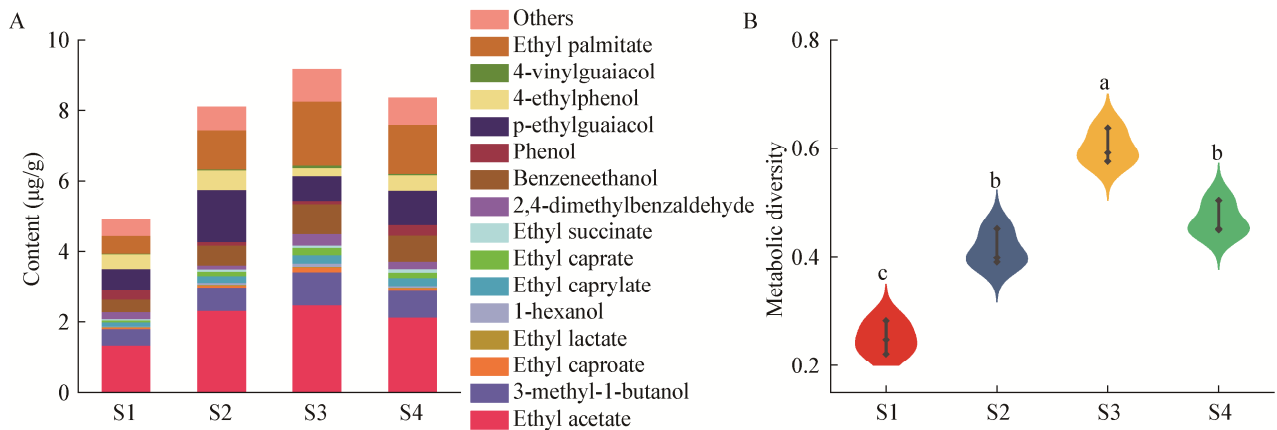


图5 4种高粱发酵第5天时风味组成(A)及其多样性(B) ($n=3$)

Figure 5 Metabolic structure (A) and diversity (B) at day 5 of fermentation with 4 sorghum ($n=3$)

注: Others 代表平均相对丰度<1%; 上方小写字母表示显著差异($P<0.05$, fisher LSD test)

Note: Others represents the average relative abundance <1%; lowercase letters above the bars indicate significant differences ($P<0.05$, fisher LSD test)

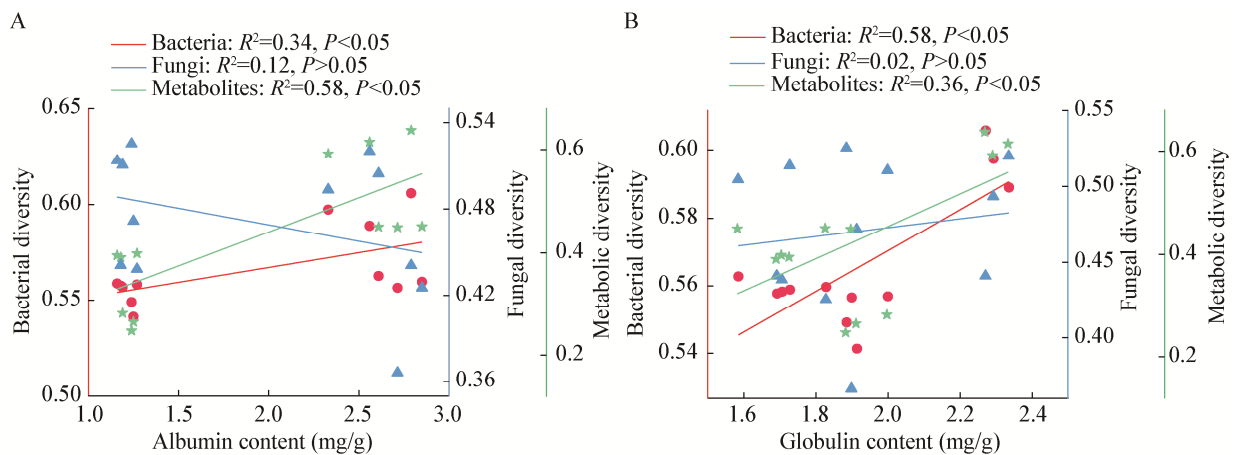


图6 谷物蛋白与微生物多样性及代谢产物多样性的相关性分析($n=3$)

Figure 6 The correlation between cereal protein and microbial and metabolic diversity ($n=3$)

注: A: 清蛋白; B: 球蛋白

Note: A: Albumin; B: Globulin

球蛋白与细菌多样性($R^2=0.58$, $P<0.05$)和代谢产物多样性($R^2=0.36$, $P<0.05$)呈显著正相关, 与优势真菌多样性无显著相关性($P>0.05$) (图 6B); 醇溶蛋白及谷蛋白与优势细菌多样性、优势真菌多样性及代谢产物多样性均不存在显著相关性($P>0.05$)。结果表明, 清蛋白和球蛋白为白酒发酵过程中的关键谷物蛋白, 而且清蛋白及球蛋白的含量对发酵第5天时的优势细菌多样性及代谢产物多样性的影响大于对优势真菌多样性的影响。

2.5 关键谷物蛋白对细菌多样性及代谢产物多样性的调控

为验证关键谷物蛋白(清蛋白和球蛋白)对优势细菌多样性及代谢产物多样性的影响, 利用蛋白添加实验在体外探究了清蛋白及球蛋白的作用。结果表明, 清蛋白和球蛋白含量与优势细菌多样性($R^2=0.93$, $P<0.05$; $R^2=0.58$, $P<0.05$)和代谢产物多样性($R^2=0.80$, $P<0.05$; $R^2=0.85$, $P<0.05$)间存在显著正相关性(图 7)。当培养基中的清蛋白和球蛋白含量

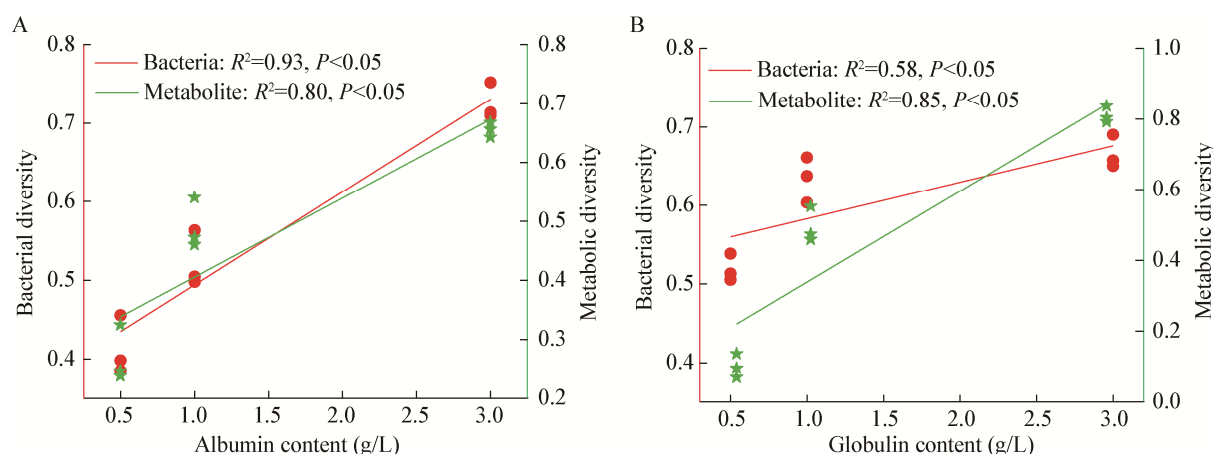


图 7 谷物蛋白含量对细菌多样性及代谢产物多样性的调控($n=3$)

Figure 7 Regulation of the content of cereal protein on bacterial diversity and metabolic diversity ($n=3$)

注: A: 清蛋白; B: 球蛋白

Note: A: Albumin; B: Globulin

升高时, 优势细菌多样性及代谢产物多样性也随之升高。其中, 当清蛋白含量为 0.5 g/L 时优势细菌多样性为 0.41、代谢产物多样性为 0.27, 当清蛋白含量升到 3.0 g/L 时优势细菌多样性为 0.72、代谢产物多样性为 0.65; 当球蛋白含量为 0.5 g/L 时优势细菌多样性为 0.52、代谢产物多样性为 0.10, 当球蛋白含量升到 3 g/L 时优势细菌多样性为 0.66、代谢产物多样性为 0.81。说明高粱中清蛋白和球蛋白含量能够对发酵过程中的优势细菌多样性和代谢产物多样性产生显著影响。

3 讨论与结论

酿造原料的筛选对发酵食品质量的控制有着重要作用。原料品种间的差异可导致各营养成分产生显著差异, 从而对发酵食品的质量造成影响。在这项研究中, 我们发现 4 个不同品种高粱的谷物蛋白组成存在显著性差异($R=0.85$, $P=0.001$), 通过模拟固态发酵, 结合多组学联用技术进一步分析发现原料中清蛋白和球蛋白的含量可对发酵过程中微生物多样性及代谢产物多样性产生显著影响, 其中对细菌多样性的影响大于对真菌多样性的影响。

谷物蛋白作为原料中的主要氮源^[24], 对微生物的生长代谢具有重要作用。其中醇溶蛋白和谷蛋白

为谷物籽粒贮藏蛋白, 氮溶解指数较低, 难被微生物利用, 而清蛋白和球蛋白因其氮溶解指数远高于醇溶蛋白和谷蛋白, 容易被微生物利用^[24]。另外, 氨基酸可驱动白酒酿造微生物群落演替及风味代谢, 这也进一步证实清蛋白和球蛋白对白酒酿造过程中微生物的生长代谢具有重要作用。

细菌作为白酒酿造过程中重要的产风味微生物, 对白酒的风味形成有重要影响。在白酒酿造过程中, *Lactobacillus*、*Pediococcus*、*Weissella*、*Candida* 和 *Bacillus* 等是主要的细菌属^[29], 并且也多被证明是风味相关微生物^[5,17]。其中, *Lactobacillus* 作为白酒发酵过程中重要的风味相关微生物^[30], 同时也是许多发酵食品中的核心功能微生物^[17]。已有研究表明, *Lactobacillus* 多为氨基酸营养缺陷型^[31], 氨基酸可显著影响 *Lactobacillus* 的生长代谢^[3]。本研究发现, 高粱中的清蛋白和球蛋白含量与优势细菌多样性和代谢产物多样性显著正相关。因此, 表明清蛋白和球蛋白是白酒酿造过程中的关键蛋白及氨基酸来源。另外, 本研究也证明可通过控制清蛋白和球蛋白含量对优势细菌多样性和代谢产物多样性进行调控。不同品种高粱清蛋白及球蛋白含量不同, 导致发酵过程中可溶解氮源及氨基酸组成产生

差异,而细菌受氨基酸的影响更大,最终导致不同品种高粱发酵过程中细菌多样性及代谢产物多样性产生显著性差异。

综上所述,本研究通过深入分析4种高粱的谷物蛋白组成及其在发酵过程中微生物多样性及代谢产物多样性的差异,明确了与发酵过程中微生物多样性及代谢产物多样性显著相关的2种关键蛋白,即清蛋白和球蛋白,并验证了清蛋白和球蛋白含量对发酵过程中细菌多样性及代谢产物多样性的调控作用,高粱中清蛋白和球蛋白的含量越高,其在发酵过程中的细菌多样性和代谢产物多样性也越高。这进一步说明了酿造原料的筛选对食品发酵过程中微生物及代谢产物多样性的调控具有重要影响,对于白酒及其他发酵食品的风味调控具有一定的指导意义。

REFERENCES

- [1] Jin GY, Zhu Y, Xu Y. Mystery behind Chinese liquor fermentation[J]. Trends in Food Science & Technology, 2017, 63: 18-28
- [2] Wu Q, Zhu Y, Fang C, Wijffels RH, Xu Y. Can we control microbiota in spontaneous food fermentation? - Chinese liquor as a case example[J]. Trends in Food Science & Technology, 2021, 110: 321-331
- [3] Wang YQ, Huang HQ, Wang SL, Mu XQ, Li SW, Qi WJ, Kong LW, Wu Q, Feng SB, Xu Y. Effects of amino acids on microbial community succession and flavor metabolism in highland barley Baijiu fermentation[J]. Microbiology China, 2021, 48(2): 414-425 (in Chinese)
- 王宇乔, 黄和强, 王石垒, 穆晓清, 李善文, 祁万军, 孔令武, 吴群, 冯声宝, 徐岩. 氨基酸对青稞酒酿造微生物群落演替及风味代谢的驱动[J]. 微生物学通报, 2021, 48(2): 414-425
- [4] Seguinot P, Bloem A, Brial P, Meudec E, Ortiz-Julien A, Camarasa C. Analysing the impact of the nature of the nitrogen source on the formation of volatile compounds to unravel the aroma metabolism of two non-*Saccharomyces* strains[J]. International Journal of Food Microbiology, 2020, 316: 108441
- [5] 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
- [6] Yang L, Fan WL, Xu Y. Metaproteomics insights into traditional fermented foods and beverages[J]. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 2020, 19(5): 2506-2529
- [7] Niccum BA, Kastman EK, Kfoury N, Jr AR, Wolfe BE. Strain-level diversity impacts cheese rind microbiome assembly and function[J]. mSystems, 2020, 5(3): e00149-20
- [8] Yang C, Zhang W, Liu RH, Li Q, Li BB, Wang SF, Song CJ, Qiao CL, Mulchandani A. Phylogenetic diversity and metabolic potential of activated sludge microbial communities in full-scale wastewater treatment plants[J]. Environmental Science & Technology, 2011, 45(17): 7408-7415
- [9] Johnson DR, Lee TK, Park J, Fenner K, Helbling DE. The functional and taxonomic richness of wastewater treatment plant microbial communities are associated with each other and with ambient nitrogen and carbon availability[J]. Environmental Microbiology, 2015, 17(12): 4851-4860
- [10] Wang SL, Xiong W, Wang YQ, Nie Y, Wu Q, Xu Y, Geisen S. Temperature-induced annual variation in microbial community changes and resulting metabolome shifts in a controlled fermentation system[J]. mSystems, 2020, 5(4): e00555-20
- [11] Wan WJ, Tan JD, Wang Y, Qin Y, He HM, Wu HQ, Zuo WL, He DL. Responses of the rhizosphere bacterial community in acidic crop soil to pH: changes in diversity, composition, interaction, and function[J]. Science of the Total Environment, 2020, 700: 134418
- [12] Tan YW, Zhong HP, Zhao D, Du H, Xu Y. Succession rate of microbial community causes flavor difference in strong-aroma Baijiu making process[J]. International Journal of Food Microbiology, 2019, 311: 108350
- [13] Li S, Li P, Feng F, Luo LX. Microbial diversity and their roles in the vinegar fermentation process[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2015, 99(12): 4997-5024
- [14] Liang R, Huang J, Wu XM, Fan J, Xu Y, Wu CD, Jin Y, Zhou RQ. Effect of raw material and starters on the metabolite constituents and microbial community diversity of fermented soy sauce[J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2019, 99(13): 5687-5695
- [15] Hounghédjé M, Johansen P, Padonou SW, Akissoé N, Arneborg N, Nielsen DS, Hounhouigan DJ, Jespersen L. Occurrence of lactic acid bacteria and yeasts at species and strain level during spontaneous fermentation of mawè, a cereal dough produced in West Africa[J]. Food Microbiology, 2018, 76: 267-278
- [16] Ren GD, Meng TZ, Ma Y. Sugars altered fungal community composition and caused high network complexity in a *Fusarium* wilt pathogen-infested soil[J]. Biology and Fertility of Soils, 2020, 56(3): 395-409
- [17] 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-e03018

- [18] De Filippis F, Genovese A, Ferranti P, Gilbert JA, Ercolini D. Metatranscriptomics reveals temperature-driven functional changes in microbiome impacting cheese maturation rate[J]. *Scientific Reports*, 2016, 6: 21871
- [19] Hong XT, Chen J, Liu L, Wu H, Tan HQ, Xie GF, Xu Q, Zou HJ, Yu WJ, Wang L, et al. Metagenomic sequencing reveals the relationship between microbiota composition and quality of Chinese rice wine[J]. *Scientific Reports*, 2016, 6: 26621
- [20] 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
- [21] Lemos LN, Fulthorpe RR, Triplett EW, Roesch LFW. Rethinking microbial diversity analysis in the high throughput sequencing era[J]. *Journal of Microbiological Methods*, 2011, 86(1): 42-51
- [22] Wang P. Effects of *Bacillus licheniformis* inoculation on the microbial community structure and metabolism during strong flavored liquor brewing process[D]. Wuxi: Master's Thesis of Jiangnan University, 2017 (in Chinese)
王鹏. 地衣芽孢杆菌强化对浓香型白酒酿造微生物群落结构和代谢的影响[D]. 无锡: 江南大学硕士学位论文, 2017
- [23] Gregory Caporaso J, 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
- [24] Chen HR, Wu Q, Xu Y. Study on preparation and physicochemical properties of brewing sorghum protein[EB/OL]. Beijing: Sciencepaper Online, 2016, <http://www.paper.edu.cn/releasepaper/content/201604-102> (in Chinese)
- 陈华蓉, 吴群, 徐岩. 酿酒高粱蛋白质的分类组成及相关特性研究[EB/OL]. 北京: 中国科技论文在线, 2016, <http://www.paper.edu.cn/releasepaper/content/201604-102>
- [25] 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
- [26] Xu W, Jing X, Ma ZY, He JS. A review on the measurement of ecosystem multifunctionality[J]. *Biodiversity Science*, 2016, 24(1): 72-84 (in Chinese)
徐炜, 井新, 马志远, 贺金生. 生态系统多功能性的测度方法[J]. *生物多样性*, 2016, 24(1): 72-84
- [27] Wagg C, Schlaeppi K, Banerjee S, Kuramae EE, Heijden MGA. Fungal-bacterial diversity and microbiome complexity predict ecosystem functioning[J]. *Nature Communications*, 2019, 10(1): 1-10
- [28] Zhang HX, Wang L, Tan YW, Wang HY, Yang F, Chen LQ, Hao F, Lv X, Du H, Xu Y. Effect of *Pichia* on shaping the fermentation microbial community of sauce-flavor Baijiu[J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2021, 336: 108898
- [29] Wang BW, Wu Q, Xu Y, Sun BG. Synergistic effect of multiple saccharifying enzymes on alcoholic fermentation for Chinese baijiu production[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2020, 86(8): e00013-20
- [30] Du RB, Wu Q, Xu Y. Chinese liquor fermentation: identification of key flavor-producing *Lactobacillus* spp. by quantitative profiling with indigenous internal standards[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2020, 86(12): e00456-20
- [31] Terrade N, Mira De Orduña R. 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