

泸型酒酒醅中梭菌群落的发酵演替规律和功能预测

马箭¹ 陆震鸣¹ 张晓娟¹ 王松涛² 沈才洪² 史劲松¹ 许正宏^{1,2,3*}

(1. 江南大学药学院 工业生物技术教育部重点实验室 江苏 无锡 214122)

(2. 国家固态酿造工程技术研究中心 四川 泸州 646000)

(3. 中国科学院天津工业生物技术研究所 天津市工业生物系统与过程工程重点实验室 天津 300308)

摘要:【目的】研究泸型酒酒醅中梭菌(Clostridia)群落的演替规律,探讨梭菌群落在酒醅发酵过程中的潜在功能。【方法】利用实时荧光定量PCR技术结合高通量测序技术研究不同发酵时间泸型酒酒醅中梭菌丰度变化;通过梭菌16S rRNA基因序列高通量测序数据分析揭示梭菌群落演替规律,并运用LEfSe分析找出标志性OTU;通过PICRUSt分析对梭菌功能组成进行预测。【结果】泸型酒发酵过程酒醅中梭菌的生物量在发酵14 d上升至最高(3.46×10^7 copies/g),梭菌占总细菌的相对丰度在发酵20 d达到最高(6.67%);对梭菌群落结构的聚类分析结果表明,发酵7 d的酒醅梭菌群落结构显著区别于其他发酵时间,主要体现为存在17个标志性OTU,其中大部分分类学地位尚不明确;PICRUSt分析显示梭菌主要参与氨糖与核糖代谢、磷酸戊糖途径,其次是果糖和甘露糖代谢、TCA循环、糖酵解途径、丙酸及丁酸代谢。【结论】泸型酒酒醅中梭菌的生物量和占细菌的相对丰度在发酵开始后的2-3周内逐渐达到最高,而梭菌群落的结构则在发酵1周内便发生了显著改变,并在发酵2-3周内趋于稳定。在发酵2-3周时有较多与丙酸、丁酸等风味物质代谢相关的基因在酒醅梭菌中被预测到。

关键词: 泸型酒, 酒醅, 梭菌, 群落演替, 功能组成

Foundation item: High Tech Development Program of China (863 Program) (No. 2012AA021301, 2013AA102106, 2014AA021501); National Nature Science Foundation of China (No. 31530055)

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

Received: January 28, 2016; Accepted: April 12, 2016; Published online (www.cnki.net): May 04, 2016

基金项目: 国家高技术研究计划项目(863计划)(No. 2012AA021301, 2013AA102106, 2014AA021501); 国家自然科学基金项目(No. 31530055)

*通讯作者: Tel/Fax: 86-510-85918206; E-mail: zhenghxu@jiangnan.edu.cn

收稿日期: 2016-01-28; 接受日期: 2016-04-12; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2016-05-04

Role of Clostridia community in fermented grains during Luzhou-flavor liquor production

MA Jian¹ LU Zhen-Ming¹ ZHANG Xiao-Juan¹ WANG Song-Tao² SHEN Cai-Hong²
SHI Jing-Song¹ XU Zheng-Hong^{1,2,3*}

(1. School of Pharmaceutical Science, Key Laboratory of Industrial Microbiology of Ministry of Education, Jiangnan University, Wuxi, Jiangsu 214122, China)

(2. National Engineering Research Center of Solid-State Brewing, Luzhou, Sichuan 646000, China)

(3. Tianjin Key Laboratory for Industrial Biological Systems and Bioprocessing Engineering, Tianjin Institute of Industrial Biotechnology, Chinese Academy of Sciences, Tianjin 300308, China)

Abstract: [Objective] The succession of community structure and potential functional composition of Clostridia in fermented grains of Luzhou-flavor liquor during the fermentation process were studied. [Methods] Real-time quantitative PCR combined with high-throughput sequencing was used to study the dynamics of Clostridia community in fermented grains. 16S rRNA gene high-throughput sequencing using specific primers was conducted to reveal the succession of Clostridia community. Biomarkers were located on OTU-level through LEfSe analysis. Predictive functional composition of Clostridia community was studied using PICRUSt. [Results] The biomass and relative abundance of Clostridia community reached their maxima at 14 d (3.46×10^7 copies/g) and 20 d (6.67%), respectively. Clustering analysis showed that the structure of Clostridia community in 7-d sample was significantly different from that in other samples. 17 OTUs were located as biomarkers, and the BLAST results of these OTUs indicated that most of them represented unclassified bacteria. PICRUSt analysis showed that Clostridia community mainly participated in amino sugar and nucleotide sugar metabolism and pentose phosphate pathway followed by fructose and mannose metabolism, citrate cycle, glycolysis, propanoate and butanoate metabolism. [Conclusion] The biomass and the relative abundance of Clostridia community in fermented grains of Luzhou-flavor liquor reached their maxima after being fermented for two to three weeks. The structure of Clostridia community shifted significantly during the first week of fermentation and then gradually recovered in the following two weeks. A number of predictive functional genes related to the metabolism of flavor compounds such as propanoate and butanoate were detected in Clostridia community during 14–21 d of fermentation.

Keywords: Luzhou-flavor liquor, Fermented grains, Clostridia community, Succession, Functional composition

泸型酒(又称浓香型白酒)产量占中国白酒70%以上,且因其窖香浓郁、绵软甘冽等风味特征而被消费者广泛接受^[1]。泸型酒的生产以高粱为主要原料,以大曲为糖化发酵剂,采用泥窖进行多菌种混合循环固态发酵。通过分离培养和分子生物学手段,发现窖池中存在的微生物主要包括酵母、霉菌、细菌、古菌,并呈现出极高的多样性^[2-3]。在发酵阶段,长期驯化形成的独特而复杂的窖内微生物群落是泸型酒独特风味形成的关键^[4]。

梭菌(Clostridia)是一系列厌氧的厚壁菌门(Firmicutes)微生物的统称,其典型为梭状芽孢杆菌

属(*Clostridium*)微生物。在浓香型白酒酿造环境,尤其是窖泥中,梭菌被认为与己酸、丁酸等酒体重要风味物质的合成密切相关^[5]。在前期研究中,已有部分梭状芽孢杆菌属微生物,如克鲁氏梭菌(*Clostridium kluyveri*)、泸型梭菌(*Clostridium lushun*)等从窖泥中被分离并鉴定^[6-7]。有趣的是,虽然已有关于窖泥中的梭菌群落的研究^[8],但是就作为发酵主体的酒醅来说,其中的梭菌群落演替目前尚未有针对性的文献报道。

本研究主要利用分子生物学手段,针对酒醅中梭菌群落的丰度变化、结构演替以及功能组成变化

进行分析,以期总结酒醅发酵过程中梭菌的演变规律,完善对梭菌在酿造过程中所起作用的认识,为完整理解浓香型白酒酿造机制提供支持。

1 材料与方 法

1.1 样品采集

本研究使用的酒醅样品采自四川泸州老窖集团酿酒基地某连续生产的窖池(长×宽×高=2.5 m×2.0 m×3.0 m)。采样时间点选择入窖后0、7、14、20、30和40 d。采样方式为在窖池近中心部位进行三点采样,每个点采样约1.0 g。所有平行样当场充分混匀后迅速放入无菌保鲜袋中,-20 °C保存。

1.2 主要试剂和仪器

引物购自上海生工生物工程有限公司;PCR试剂、琼脂糖凝胶DNA回收试剂盒、pMD-19T载体、2×SYBR Premix ExTaq 预混液购自大连宝生物公司;PowerSoil®DNA提取试剂盒购自美国MOBIO公司。

NanoDrop 3300 分光光度计,美国 Thermo Fisher Scientific 公司;荧光定量 PCR 仪 Bio-Rad CFX Real-Time System,美国 Bio-Rad 公司;454 平台测序仪 Genome Sequencer FLX Titanium,美国 Roche 公司;Illumina 平台测序仪 Illumina MiSeq Benchtop Sequencer,美国 Illumina 公司。

1.3 宏基因组提取

每份样品准确称取0.2 g进行宏基因组提取:采用PowerSoil®DNA提取试剂盒,操作步骤参照说明书。每一个发酵时间点设两个平行,提取后等体积混合。对DNA浓度和质量进行测定,分装并冻存于-80 °C。

1.4 梭菌实时荧光定量 PCR 条件及标准曲线制作

每个DNA样品设3个复孔,采用20 μL体系:预混液10 μL,10 μmol/L上下游引物(SJ-F/SJ-R)^[8]各1 μL,模板(统一稀释至10 mg/L)2 μL,ddH₂O 7 μL。反应条件:94 °C 5min;94 °C 15 s,58 °C 25 s,共50个循环。熔解曲线绘制:55 °C 梯度升

温至95 °C,每0.5 min读板一次。

以本实验室分离的 *Clostridium kluyveri* 菌株 CKL01 的 16S rRNA 基因扩增产物(27F/1492R)连接载体,转化大肠杆菌 JM109。提取质粒,测定吸光值并换算为质粒拷贝数,10 倍梯度稀释为模板制作标准曲线^[9]。

1.5 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 V1/V3 高变区(大肠杆菌 16S rRNA 基因位点 5-534)^[10],退火温度为 55 °C;针对梭菌的引物 SJ-F/SJ-R 扩增 V4/V5 高变区(大肠杆菌 16S rRNA 基因位点 679-952),退火温度为 56.5 °C。在每条引物 5'端加上 18 bp 条码序列作为样本标记。文库构建时每份样品设置 2 个扩增平行,测定浓度后混合,上机测序。V1/V3 区扩增产物采用 454 平台测序仪进行测序;V4/V5 区扩增产物采用 Illumina 平台测序仪进行测序(上海美吉)。

1.6 高通量测序数据统计分析

测序下机文件使用 Mothur 进行融合,并依据条码序列区分样品。质检并滤除符合以下其中任意一项的序列:短于 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。使用 UCLUST 算法 (http://drive5.com/usearch/manual/uclust_algo.html)依照 97%相似度进行 OTU 划分,并依照 80%置信度采用 Greengenes 和 RDP 数据库对各 OTU 进行分类学注释。

对 SJ-F/SJ-R 引物测序结果,根据各 OTU 相对丰度变化采用 Person 距离进行相似度计算,并依据 average-linkage 对样品进行聚类。不同聚类的标志性 OTU 通过 LEfSe (LDA Effect Size)分析找出^[11]。各样品序列的注释结果运用 PICRUSt (Phylogenetic investigation of communities by reconstruction of unobserved states)进行功能预测^[12]。

2 结果与分析

2.1 不同发酵时间酒醅中梭菌丰度变化

以 2.52×10^7 copies/μL 为起始浓度,设 6 组连续 10 倍梯度稀释的质粒模板,制作标准曲线。扩增曲线显示 C_q 值均落在 10-30 之间,数值可信;

溶解曲线于约 84 °C 显示单一峰,证明扩增特异性良好。以 C_q 值为横坐标,模板浓度对数为纵坐标,线性拟合得到标准曲线方程, R^2 为 0.997 65,证明标准曲线线性良好。见图 1。

依据标准曲线计算样品 DNA 中梭菌 16S rRNA 基因拷贝数,并换算为不同发酵时间每克酒醅样品中梭菌 16S rRNA 基因拷贝数。结果显示酒醅中梭菌 16S rRNA 基因拷贝数随发酵时间呈先上升后下降趋势;在发酵 14 d 和 20 d 达到最大值 3.46×10^7 copies/g (图 2)。

各样品 V3/V4 区测序质检合格的 Reads 数统一至 4 454,并对其中梭菌的相对丰度进行统计。结果显示酒醅中梭菌属于低丰度微生物,占总细菌的相对丰度在 0.04%–6.67%间浮动,呈现先上升后下降趋势(图 2)。在 0 d 样品中相对丰度最小,20 d 样品中相对丰度最大;入窖 7 d 内梭菌相对丰度上

升最为显著。

2.2 不同发酵时间酒醅梭菌群落结构变化

由于酒醅中梭菌相对丰度较低,因此采用 SJ-F/SJ-R 引物选择性扩增梭菌 V4/V5 高变区。各样品质检合格的 Reads 数统一至 20 000,依 97% 相似度划分共得到 152 个相对丰度大于千分之一的 OTU。依照其中前 100 个 OTU 在各样品中的相对丰度变化对样品聚类(图 3),发现在发酵 7 d 样品中梭菌群落结构与其他样品有较大差异;此外,30 d、40 d 样品形成一个聚类,而 0、14、20 d 样品形成另一聚类。其中 14 d 样品又与 0 d、20 d 样品具有一定差异。聚类结果表明:酒醅梭菌群落结构在入窖一周内发生了较为剧烈的变化,随后逐渐回复,并在发酵第三周左右恢复至与入窖时接近。而在发酵后期,伴随着生物量的衰减,梭菌群落结构又发生了一定程度的变化。

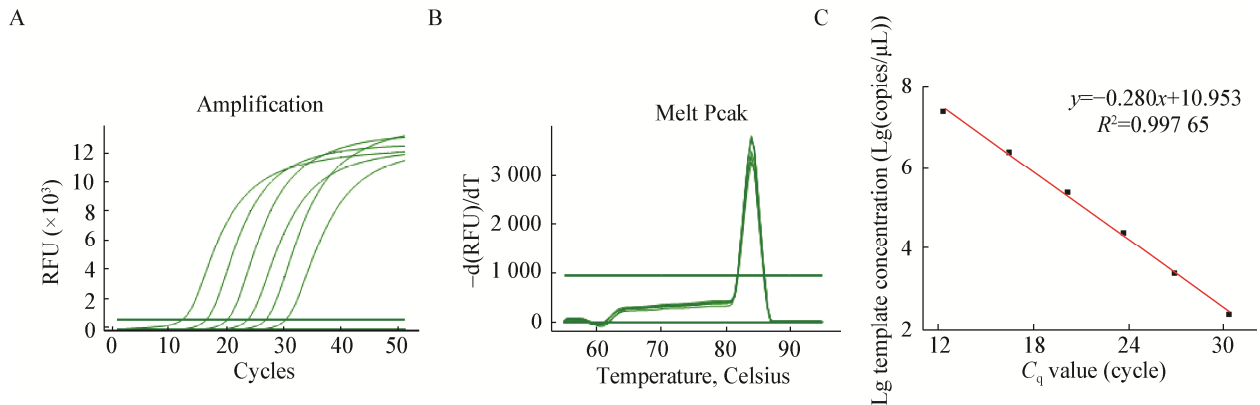


图 1 SJ-F/SJ-R 引物对 *Clostridium kluyveri* 进行实时荧光定量 PCR

Figure 1 Real-time quantitative PCR of *Clostridium kluyveri* using primer pair SJ-F/SJ-R

Note: A–C: amplification curve, melting curve and standard curve.

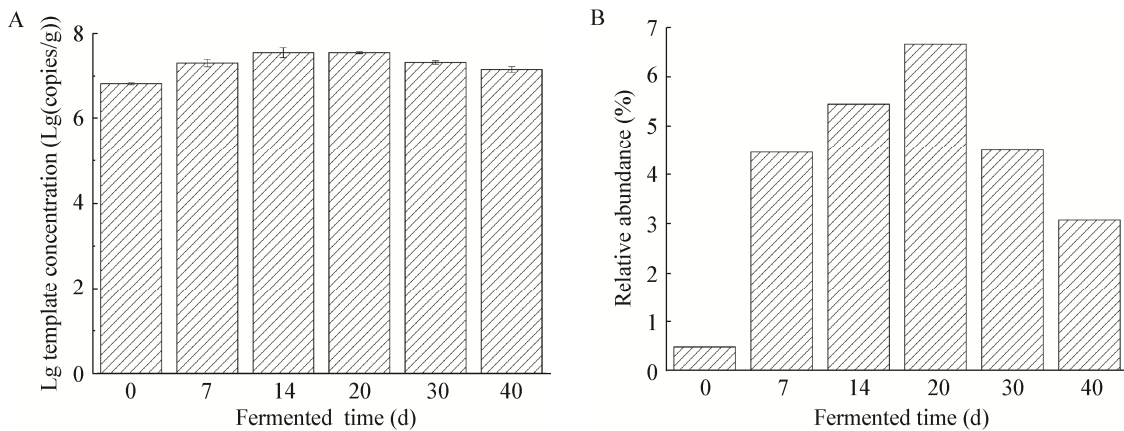


图 2 不同发酵时间酒醅梭菌 16S rRNA 基因拷贝数(A)及占总细菌相对丰度(B)

Figure 2 16S rRNA gene copy number (A) and relative abundance (B) of *Clostridia* community in different samples

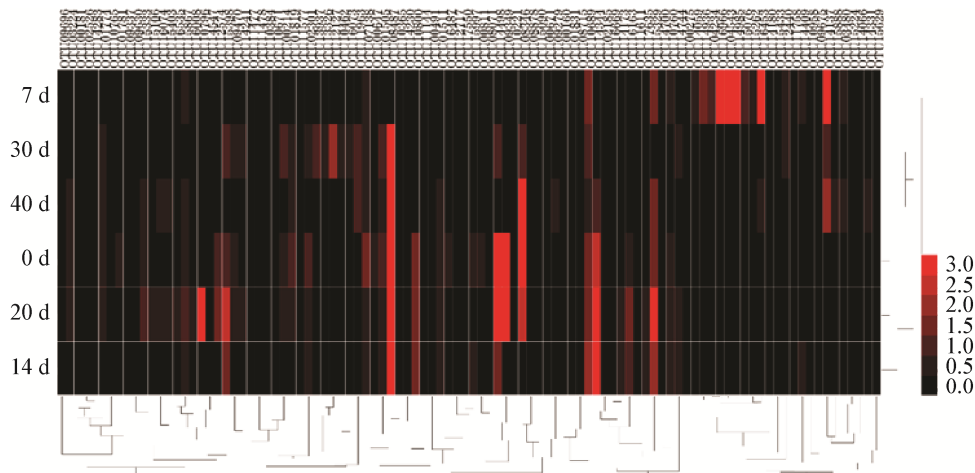


图3 SJ-F/SJ-R 测序结果前 100 个 OTU 在不同样品中的分布

Figure 3 Distribution of the most abundant 100 OTUs of SJ-F/SJ-R sequences in different samples

由于发现发酵 7 d 样品梭菌群落结构较其他样品有较大差异,因此以发酵 7 d 样品为一组,其他样品为另一组,运用 LEfSe 分析差异 OTU (图 4)。结果显示有 17 个 OTU 在发酵 7 d 样品与其他样品中相对丰度有显著差异;其中 OTU 7298、OTU 9349、OTU 14137、OTU 6251 在发酵 7 d 样品中相对丰度显著高于其他样品,而其余 13 个 OTU 则相反。BLAST 结果显示各 OTU 代表序列大部分与 GenBank 现有收录序列相似度较低(表 1),可能为一些分类地位尚不明确的微生物。

2.3 不同发酵时间酒醅梭菌代谢功能组成变化 运用 PICRUSt 对不同发酵时间点样品梭菌功能组

成进行预测(图 5),发现在主要代谢分类上碳水化合物代谢、氨基酸代谢、辅因子及维生素代谢以及核酸代谢有较多基因被预测。与发酵 0 d 相比,发酵 7 d 酒醅中预测到基因数大幅度减少,而后逐渐回复,在发酵 20 d 时基本与入窖时持平;在发酵后期预测到基因数再次减少。这与梭菌群落结构的变化趋势相符合。

单独对碳水化合物功能预测结果进行分析,发现各代谢途径上的预测基因数量变化趋势也基本与梭菌群落结构变化趋势相符合(图 6);其中氨基糖与核糖代谢、磷酸戊糖途径显著高于其他代谢途径,其次是三羧酸循环、糖酵解、丙酸及丁酸代谢途径上的一些基因。

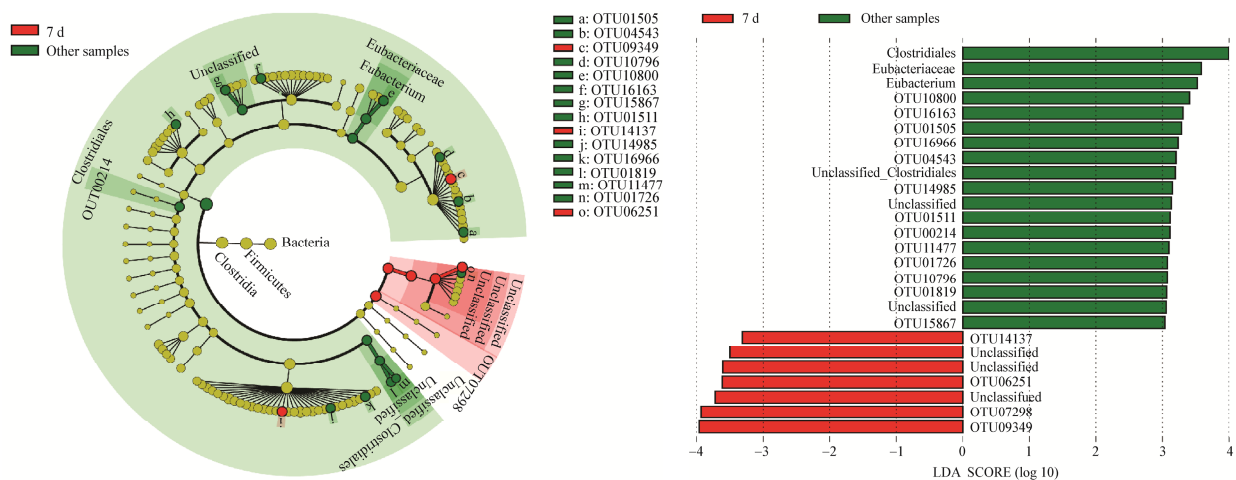


图4 发酵 7 d 样品与其他样品差异 OTU

Figure 4 Biomarkers of sample 7 d and other samples on OTU-level

表 1 差异 OTU 代表序列 BLAST 比对结果
Table 1 BLAST results of each biomarker's representative sequence

OTU 编号 OTU No.	参考菌株 Reference strain	E 值 E-value	相似度 Identity (%)	登录号 Accession No.
7298	<i>Hydrogenisporaethanolica</i> LX-B	2.00E-122	95	NR_125455.1
9349	<i>Clostridium butyricum</i> JCM 1391	1.00E-138	99	NR_113244.1
14137	<i>Clostridium tagluense</i> A121	3.00E-115	94	NR_043698.1
6251	<i>Sporomusaaerivorans</i> TMAO3	4.00E-119	95	NR_028991.1
214	<i>Desulfosporosinusacidiphilus</i> SJ4	9.00E-121	95	NR_074132.1
1505	<i>Clostridium tyrobutyricum</i> ATCC 25755	9.00E-131	97	NR_044718.2
4543	<i>Clostridium tyrobutyricum</i> ATCC 25755	2.00E-137	99	NR_044718.2
10796	<i>Clostridium butyricum</i> JCM 1391	3.00E-130	97	NR_113244.1
10800	<i>Eubacteriumpyruvativorans</i> I-6	5.00E-128	97	NR_042074.1
16163	<i>Sedimentibacterhydroxybenzoicus</i> JW/Z-1	1.00E-133	98	NR_029146.1
15867	<i>Sedimentibacterhydroxybenzoicus</i> JW/Z-1	1.00E-118	95	NR_029146.1
1511	[<i>Clostridium</i>] <i>populeti</i> 743A	3.00E-130	97	NR_026103.1
14985	<i>Catabacterhongkongensis</i> HKU16	4.00E-119	95	NR_115269.1
16966	<i>Alkaliphilusoremlandii</i> OhILAs	3.00E-120	95	NR_074435.1
1819	<i>Oxobacterpfennigii</i> DSM 3222	2.00E-112	93	NR_117690.2
11477	<i>Clostridium sporogenes</i> JCM 1416	7.00E-122	95	NR_113245.1
1726	<i>Hydrogenisporaethanolica</i> LX-B	9.00E-126	96	NR_125455.1

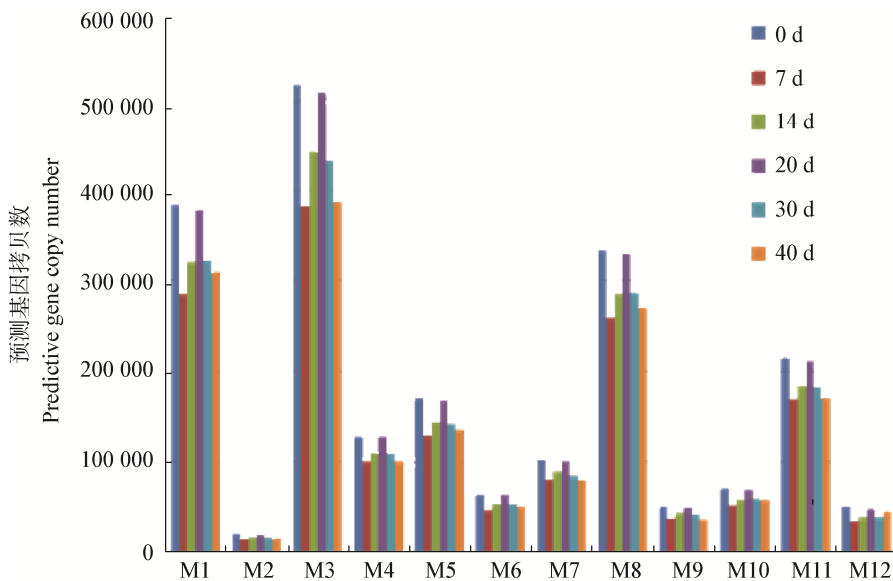


图 5 梭菌群落各代谢分类功能预测

Figure 5 Functional prediction of Clostridia community in catalog ‘metabolism’

注：M1：氨基酸代谢；M2：其他次级代谢物生物合成；M3：碳水化合物代谢；M4：能量代谢；M5：酶家族；M6：多糖生物合成及代谢；M7：脂质代谢；M8：辅因子及维生素代谢；M9：其他氨基酸代谢；M10：萜类及聚酮代谢；M11：核酸代谢；M12：外源性化合物生物降解及代谢。

Note: M1: Amino acid metabolism; M2: Biosynthesis of other secondary metabolites; M3: Carbohydrate metabolism; M4: Energy metabolism; M5: Enzyme families; M6: Glycan biosynthesis and metabolism; M7: Lipid metabolism; M8: Metabolism of Co-factors and vitamins; M9: Metabolism of other amino acids; M10: Metabolism of terpenoids and polyketides; M11: Nucleotide metabolism; M12: Xenobiotics biodegradation and metabolism.

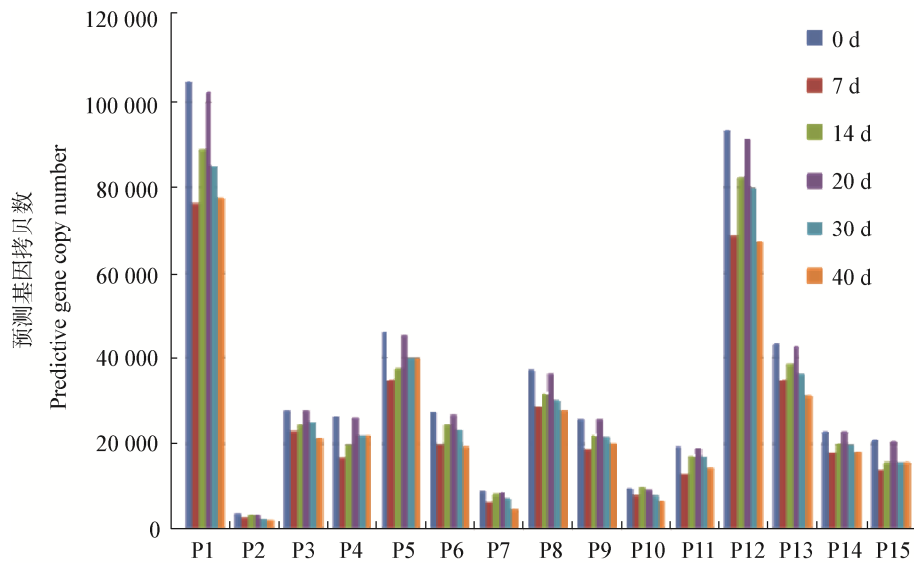


图6 梭菌群落碳水化合物代谢个途径功能预测

Figure 6 Functional prediction of Clostridia community in catalog 'carbohydrate metabolism'

注: 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。

Note: P1: Amino sugar and nucleotide sugar metabolism; P2: Ascorbate and aldarate metabolism; P3: Butanoate metabolism; P4: C5-Branched dibasic acid metabolism; P5: Citrate cycle (TCA cycle); P6: Fructose and mannose metabolism; P7: Galactose metabolism; P8: Glycolysis/Gluconeogenesis; P9: Glyoxylate and dicarboxylate metabolism; P10: Inositol phosphate metabolism; P11: Pentose and glucuronate interconversions; P12: Pentose phosphate pathway; P13: Propanoate metabolism; P14: Pyruvate metabolism; P15: Starch and sucrose metabolism.

3 讨论

在浓香型白酒中,己酸和丁酸是合成主体风味化合物己酸乙酯和丁酸乙酯的重要前体^[13]。前期研究发现包括梭状芽孢杆菌在内的各种梭菌与白酒中己酸和丁酸的合成具有密切关系^[5]。由于梭菌在窖泥中相对丰度较高^[14],而酒醅中则是乳酸菌占有绝对优势^[15-16],因此目前为止绝大多数梭菌相关研究集中于窖泥^[17];考虑到酒醅是窖内发酵的主体,酒醅微生物产生的风味物质会在酒醅蒸馏阶段进入酒体^[18],因此本研究就酒醅中的梭菌群落进行了考察。

通过实时荧光定量 PCR 和高通量测序数据分析,我们发现酒醅发酵过程中梭菌的 16S rRNA 基因拷贝数在 10^6 – 10^8 之间,平均相对丰度占总细菌的 4.10% 左右,属于低丰度微生物。同时梭菌的生物量和在细菌群落中的相对丰度均呈现先上升后

下降趋势,在 14–21 d 内达到最高。前期的生物量上升可能因为封窖后窖池内逐渐形成的厌氧环境有利于梭菌的繁殖。另外,发酵过程中酒醅酸度的逐级增加会导致许多不耐酸的微生物消亡,而梭菌具有一定的耐受和代谢有机酸的能力^[19],这可能是发酵 7 d 内梭菌相对丰度大幅升高的重要原因。

针对梭菌进行高通量测序,并依据优势 OTU 对样本进行聚类,我们发现发酵 7 d 样品的梭菌群落结构与其他样品显著不同。LEfSe 分析发现发酵 7 d 样品与其他样品相比存在 17 个主要差异 OTU,代表序列 BLAST 结果显示主要为一些分类地位尚不明确的微生物,有待进一步研究。

本研究采用了 PICRUSt 分析对酒醅中梭菌群落进行了功能预测,尤其是碳水化合物代谢相关途径的功能预测,结果显示梭菌能够利用多种底物,并对酒体风味物质的合成起到了一定作用。结合梭菌生物量的变化,我们发现在发酵 14–21 d 时有较

多相关基因被预测到。此外,在不考虑生物量影响的前提下,梭菌的代谢功能组成变化基本与群落结构变化趋势一致,说明梭菌群落结构的变化是造成其整体代谢功能组成变化的重要原因。

综上所述,本研究综合生物量、群落结构及功能组成三个方面,对泸型酒发酵过程酒醅中梭菌群落进行了考察,为深入理解梭菌在泸型酒酿造中的作用提供了理论依据。

参 考 文 献

- [1] Tao Y, Li JB, Rui JP, et al. Prokaryotic communities in pit mud from different-aged cellars used for the production of Chinese strong-flavored liquor[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2014, 80(7): 2254-2260
- [2] Li K, Zhang Q, Zhong XT, et al. Microbial diversity and succession in the Chinese Luzhou-flavor liquor fermenting cover lees as evaluated by SSU rRNA profiles[J]. *Indian Journal of Microbiology*, 2013, 53(4): 425-431
- [3] Wang CD, Chen Q, Wang Q, et al. Long-term batch brewing accumulates adaptive microbes, which comprehensively produce more flavorful Chinese liquors[J]. *Food Research International*, 2014, 62: 894-901
- [4] Hou XG, Wang JY, Li XS, 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)
侯小歌, 王俊英, 李学思, 等. 浓香型白酒糟醅及窖泥产香功能菌的研究进展[J]. *微生物学通报*, 2013, 40(7): 1257-1265
- [5] Lei GD, Yao WC, Tang YM, et al. Research on the distribution of important functional microbial communities in LuzhouLaojiao pit mud and their metabolic products[J]. *Liquor-Making Science & Technology*, 2012(11): 54-57 (in Chinese)
雷光电, 姚万春, 唐玉明, 等. 泸州老窖窖泥中重要功能菌群分布及代谢产物研究[J]. *酿酒科技*, 2012(11): 54-57
- [6] 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[J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2015, 214: 116-122
- [7] Wu YY. Applied theory & practice of Lu-type *Clostridium lushum* fermentation[J]. *Liquor-Making Science & Technology*, 2007(11): 131-132,135 (in Chinese)
吴衍庸. 泸型梭菌己酸发酵应用的理论与实践[J]. *酿酒科技*, 2007(11): 131-132,135
- [8] Hu XL, Wang HY, Wu Q, et al. Development, validation and application of specific primers for analyzing the Clostridial diversity in dark fermentation pit mud by PCR-DGGE[J]. *Bioresource Technology*, 2014, 163: 40-47
- [9] Tao JL, Lu ZM, Wang ZM, et al. Detection of the variation of microorganisms in acetic acid fermentation of Zhenjiang aromatic vinegar through real-time quantitative PCR[J]. *Food and Fermentation Industries*, 2013, 39(2): 156-160 (in Chinese)
陶京兰, 陆震鸣, 王宗敏, 等. 实时荧光定量 PCR 监测镇江香醋醋酸发酵过程中微生物变化[J]. *食品与发酵工业*, 2013, 39(2): 156-160
- [10] Huang S, Yang F, Zeng XW, et al. Preliminary characterization of the oral microbiota of Chinese adults with and without gingivitis[J]. *BMC Oral Health*, 2011, 11: 33
- [11] Segata N, Izard J, Waldron L, et al. Metagenomic biomarker discovery and explanation[J]. *Genome Biology*, 2011, 12(6): R60
- [12] Langille MGI, Zaneveld J, Caporaso JG, et al. Predictive functional profiling of microbial communities using 16S rRNA marker gene sequences[J]. *Nature Biotechnology*, 2013, 31(9): 814-821
- [13] Yan SB, Wang SC, Wei GG, et al. Investigation of the main parameters during the fermentation of Chinese Luzhou-flavor liquor[J]. *Journal of the Institute of Brewing*, 2015, 121(1): 145-154
- [14] Liu MK, Zhao K, Tang YM, et al. Analysis of *Clostridium* cluster I community diversity in pit mud used in manufacture of Chinese Luzhou-flavor liquor[J]. *Food Science and Biotechnology*, 2015, 24(3): 995-1000
- [15] Zhang WX, Qiao ZW, Hu C, 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 (Engineering Science Edition)*, 2005, 37(5): 82-87 (in Chinese)
张文学, 乔宗伟, 胡承, 等. PCR 技术对浓香型白酒糟醅细菌菌群的解析[J]. *四川大学学报: 工程科学版*, 2005, 37(5): 82-87
- [16] Zhang WX, Qiao ZW, Shigematsu T, et al. Analysis of the bacterial community in *Zaopei* during production of Chinese *Luzhou-flavor* liquor[J]. *Journal of the Institute of Brewing*, 2005, 111(2): 215-222
- [17] Zheng J, Liang R, Zhang LQ, 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
- [18] Lang ZW, Lu ZM, Gong JS, et al. Compositional discrepancy of volatile compounds in fermented grains and distilled grains of Luzhou-flavor liquor[J]. *Food and Fermentation Industries*, 2015, 41(7): 34-37 (in Chinese)
郎召伟, 陆震鸣, 龚劲松, 等. 泸型酒蒸馏前后酒醅中挥发性物质的差异性分析[J]. *食品与发酵工业*, 2015, 41(7): 34-37
- [19] Vital M, Gao JR, Rizzo M, et al. Diet is a major factor governing the fecal butyrate-producing community structure across *Mammalia*, *Aves* and *Reptilia*[J]. *The ISME Journal*, 2015, 9(4): 832-843