

## 研究报告

## 芝麻香型白酒发酵过程中乳酸菌多样性及其演替规律

邢敏钰 杜海 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 酿酒科学与酶技术中心

江苏 无锡 214122)

**摘要:**【背景】乳酸菌是白酒发酵过程中一类非常重要的微生物,其种类及动态变化对于白酒品质具有重要影响。然而,目前对于芝麻香型白酒发酵过程中乳酸菌群落结构及其演替规律的认识并不全面。【目的】揭示芝麻香型白酒发酵过程中乳酸菌的多样性及菌群的演替规律,为更好地探索白酒酿造机理和控制白酒品质提供生物学依据。【方法】利用高通量测序技术对芝麻香型白酒发酵过程中乳酸菌菌群演替进行跟踪分析,同时采用实时荧光定量 PCR 对发酵过程中乳酸菌的生物量进行定量分析。【结果】高通量测序结果显示,芝麻香型白酒发酵过程涉及 5 个属的乳酸菌:魏斯氏菌属(*Weissella*)、片球菌属(*Pediococcus*)、乳杆菌属(*Lactobacillus*)、明串珠菌属(*Leuconostoc*)和乳球菌属(*Lactococcus*),共计 43 种乳酸菌。其中,在发酵过程中平均相对丰度大于 0.5% 的乳酸菌有 10 种,分别是类肠膜魏斯氏菌(*Weissella paramesenteroides*)、食蜜魏斯氏菌(*Weissella cibaria*)、融合魏斯氏菌(*Weissella confusa*)、戊糖片球菌(*Pediococcus pentosaceus*)、假肠膜明串珠菌(*Leuconostoc pseudomesenteroides*)、发酵乳杆菌(*Lactobacillus fermentum*)、植物乳杆菌(*Lactobacillus plantarum*)、副干酪乳杆菌(*Lactobacillus paracasei*)、耐酸乳杆菌(*Lactobacillus acetotolerans*)和 *Lactobacillus* sp.。在堆积发酵过程中, *Weissella* 属占细菌总量的 50% 以上,其次是 *Pediococcus* 属和 *Lactobacillus* 属,而 *Leuconostoc* 属和 *Lactococcus* 属相对较少。在窖池发酵过程中 *Lactobacillus* 属的乳酸菌逐渐成为优势细菌,尤其是 *Lactobacillus* sp. 在窖池发酵中后期相对丰度达到 80% 以上。实时荧光定量 PCR 结果显示,在堆积发酵和窖池发酵前期乳酸菌总量变化不大;从窖池发酵 5 d 开始,乳酸菌总量迅速上升,30 d 时达到最大值。【结论】对白酒发酵过程中乳酸菌种类及动态变化的研究有助于探究白酒酿造过程中乳酸菌功能,进而解析白酒酿造机理,最终达到控制白酒品质的目的。

**关键词:** 乳酸菌, 多样性, 演替规律

**Foundation items:** National Natural Science Foundation of China (31501469, 31530055); Natural Science Foundation of Jiangsu Province (BK20150143); Fundamental Research Funds for the Central Universities (JUSRP11537); Jiangsu Province “Collaborative Innovation Center for Advanced Industrial Fermentation” Industry Development Program; The “3C” Plan of Chinese Liquor

\*Corresponding author: Tel: 86-510-85918201; E-mail: yxu@jiangnan.edu.cn

**Received:** February 21, 2017; **Accepted:** April 18, 2017; **Published online** (www.cnki.net): June 02, 2017

**基金项目:** 国家自然科学基金(31501469, 31530055); 江苏省自然科学基金(BK20150143); 中央高校基本科研业务费专项资金(JUSRP11537); 江苏省现代工业发酵协同创新中心行业发展项目; 中国白酒“3C”计划

\*通信作者: Tel: 86-510-85918201; E-mail: yxu@jiangnan.edu.cn

**收稿日期:** 2017-02-21; **接受日期:** 2017-04-18; **网络首发日期**(www.cnki.net): 2017-06-02

## Diversity and succession of lactic acid bacteria during sesame-flavor liquor fermentation

XING Min-Yu DU Hai XU Yan\*

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

**Abstract: [Background]** Lactic acid bacteria are important in liquor fermentation, and the diversity and succession of lactic acid bacteria have important influence on liquor quality. However, the structure and succession of lactic acid bacteria communities are not clear during sesame-flavor liquor fermentation. **[Objective]** We studied the diversity and succession of lactic acid bacteria communities during sesame-flavor liquor fermentation for better process control and product quality. **[Methods]** High-throughput sequencing was used to analyze lactic acid bacteria communities during sesame-flavor liquor fermentation. Biomass of lactic acid bacteria was quantified by real-time qPCR. **[Results]** Lactic acid bacteria in sesame-flavor liquor fermentation included *Weissella*, *Pediococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, and *Lactococcus*, classified to 43 species. Ten species of lactic acid bacteria were observed higher than 0.5%, including *Weissella paramesenteroides*, *Weissella cibaria*, *Weissella confuse*, *Pediococcus pentosaceus*, *Leuconostoc pseudomesenteroides*, *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus acetotolerans* and *Lactobacillus* sp.. In heap-fermentation stage, *Weissella* was more than half of the total bacteria, followed by *Pediococcus* and *Lactobacillus*. *Leuconostoc* and *Lactococcus* were present in low numbers. In pit-fermentation stage, *Lactobacillus* became the predominant bacteria, and the relative abundance of *Lactobacillus* sp. was up to 80% in the mid and later stage of pit-fermentation. During heap-fermentation and the early stage of pit-fermentation, the biomass of lactic acid bacteria changed little. After 5 days of pit-fermentation, the biomass of lactic acid bacteria increased fast, and reached the maximum at 30 days. **[Conclusion]** The knowledge of diversity and succession of lactic acid bacteria during sesame-flavor liquor fermentation will help understand the roles of lactic acid bacteria in liquor production with better process control and product quality.

**Keywords:** Lactic acid bacteria, Diversity, Succession

乳酸菌是食品发酵过程中普遍存在的一类微生物<sup>[1]</sup>,它能够产生乳酸、乙酸等代谢产物<sup>[2]</sup>,直接影响食品的风味。乳酸菌还可以通过产生有机酸、竞争营养成分、产生抗菌素等途径抑制其他微生物的生长<sup>[3-6]</sup>,从而调节发酵过程中菌群结构,间接影响发酵食品的品质。作为一种具有独特风味的传统发酵食品,白酒是由细菌、酵母、霉菌等多种微生物构成的酿造微生物群落进行自然发酵形成的<sup>[7]</sup>,其中乳酸菌是白酒发酵中后期的优势细菌<sup>[8]</sup>。乳酸菌的种类及群落动态对白酒品质至关重要。因此,解析白酒发酵过程中乳酸菌多样性和群落演替规律是探究白酒酿造机理、控制白酒质量必不可少的环节。

作为 20 世纪 60 年代出现的一种创新香型白酒,

芝麻香型白酒不仅融合了浓、清、酱三大香型的优点,而且采用了大量现代科技手段,具有高度的机械化<sup>[9]</sup>。芝麻香型白酒将高温大曲、麸曲(主要指河内白曲)、生香酵母曲、细菌曲混合作为糖化发酵剂,发酵过程中主要的酵母、霉菌、芽孢杆菌来源相对清楚<sup>[10-12]</sup>。然而对于芝麻香型白酒发酵过程中乳酸菌多样性及其动态的研究并不全面。目前主要是采用变性梯度凝胶电泳(PCR-DGGE)对发酵过程中的乳酸菌群进行研究,发现芝麻香型白酒酿造过程中含有 *Weissella cibaria*、*Leuconostoc mesenteroides*、*Lactobacillus acetotolerans* 等多种乳酸菌,其中 *Lactobacillus acetotolerans* 在芝麻香型白酒发酵后期占优势<sup>[13-14]</sup>。但是,传统的可培养技术和 PCR-DGGE 等研究手段仍然存在一定的

局限性,不能准确地反映发酵过程中乳酸菌群落结构的实际状况。随着现代分子技术的发展,高通量测序技术(High-throughput sequencing)可以进一步深入分析微生物群落结构,具有通量高、检测灵敏等特点,可以一次性并行测序数百万条以上 DNA 分子,全面分析发酵过程中基因组信息,这一技术目前已被广泛应用于分析奶酪<sup>[15]</sup>、酸面团<sup>[16]</sup>等传统发酵食品的微生物群落结构。

本研究运用 MiSeq 高通量测序技术考察芝麻香型白酒发酵过程中乳酸菌的群落结构,解析乳酸菌菌群演替规律,确定芝麻香型白酒中重要的乳酸菌菌种,同时利用实时荧光定量 PCR 分析发酵过程中乳酸菌生物量的动态变化规律,为深入探究乳酸菌在白酒发酵过程中的功能与作用提供重要依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 样品的采集

样品为山东芝麻香型白酒酒醅。芝麻香型白酒酿造分为堆积发酵和窖池发酵两个发酵阶段,跟踪采集了芝麻香型白酒酿造过程中堆积发酵和窖池发酵过程中的酒醅。选择 I、II 两个班组堆积酒醅作为平行样品进行跟踪取样,不同取样位置取 50 g 左右酒醅混合成一个样品。堆积发酵周期为 18 h,每隔 6 h 取一次样品,取样时间分别为 0、6、12、18 h。窖池发酵周期为 50 d,取样时间分别为 3、5、10、15、20、25、30、35、40、50 d。将采集的酒醅样品密封, -80 °C 保存。

### 1.2 主要试剂和仪器

磷酸二氢钠、磷酸氢二钠、10 mmol/L Tris-HCl (pH 8.0)、氯化钠、10% SDS、乙酸钠、三氯甲烷、异戊醇、乙醇购自国药集团化学试剂(北京)有限公司;饱和酚溶液、2×SG Fast qPCR Master Mix (High Rox)购自生工生物工程(上海)股份有限公司。

冷冻离心机, Beckman Coulter 公司; Mini-Beadbeater 细胞破碎仪, Biospec 公司; Genius 3 漩涡振荡器, IKA 公司;真空干燥箱,上海一恒科技有限公司; NanoDrop 8000 蛋白核酸测定分光光度计、荧光定量 qPCR, Thermo Fisher Scientific

公司。

### 1.3 DNA 的提取、PCR 扩增及测序

准确称取 7 g 酒醅,加入 20 mL 无菌的 PBS 缓冲液(0.042 3 mol/L 磷酸二氢钠, 0.057 7 mol/L 磷酸氢二钠)悬浮,漩涡振荡, 300×g 离心 5 min, 收集上清液。将上清液 10 000×g 离心 15 min 收集细胞沉淀。DNA 的提取参考 Wang 等<sup>[14]</sup>的方法。采用适用于大多数细菌的 16S rRNA 基因 V3-V4 区通用引物 338F (5'-ACTCCTACGGGAGGCAGCA-3') 和 806R (5'-GGACTACHVGGGTWTCTAAT-3')。PCR 扩增体系(20 μL): 5×FastPfu 缓冲液 4 μL, 2.5 mmol/L dNTPs 2 μL, 5 μmol/L 上、下游引物各 0.8 μL, FastPfu 聚合酶 0.4 μL, 样品基因组模板 DNA 10 ng, 超纯水补足至 20 μL。PCR 反应条件: 95 °C 3 min; 95 °C 30 s, 55 °C 30 s, 72 °C 45 s, 共 27 个循环; 72 °C 10 min<sup>[17]</sup>。将 PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳分析,对 DNA 条带进行切胶纯化回收。纯化后的 PCR 产物进行精确定量,根据定量结果混合不同样品的 PCR 产物。构建 MiSeq 文库,使用 Illumina MiSeq PE300 测序平台测序。通过 QIIME (v1.8.0)和 Mothur 对测序结果分析处理,去掉质量不好的序列、长度小于 150 bp 的序列及含嵌合体的序列,并将相似度大于 97%的序列聚类为一个操作分类单元 OTU (Operational taxonomic unit)。计算 Shannon 指数(反映样品的多样性程度)和 Chao1 指数(反映样品中群落丰富度),评估样品微生物多样性。利用在线比对引擎 BLAST 将 OTU 的代表序列在美国国家生物技术信息中心(National Center for Biotechnology Information, NCBI)网站上与 GenBank 数据库中的序列进行比对,获得 OTU 的物种信息。

### 1.4 实时荧光定量 PCR

选择乳酸菌特异性定量分析引物 Lac1 (5'-AGC AGTAGGGAATCTTCCA-3')和 Lac2 (5'-ATTYCAC CGCTACACATG-3')对发酵过程中乳酸菌总量进行定量<sup>[18]</sup>。20 μL 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  $\mu\text{L}$ , 模板 1  $\mu\text{L}$ , 超纯水 8.2  $\mu\text{L}$ 。反应条件: 95  $^{\circ}\text{C}$  3 min; 95  $^{\circ}\text{C}$  3 s, 60  $^{\circ}\text{C}$  30 s, 共 40 个循环; 95  $^{\circ}\text{C}$  5 s, 60  $^{\circ}\text{C}$  30 s。以 *Lactobacillus fermentum* 为标准菌株, 培养后显微镜计数, 并提取基因组作为模板进行实时荧光定量 PCR 特异性扩增, 以含有 *Lactobacillus fermentum* 个数的对数为横坐标,  $C_t$  值为纵坐标绘制标准曲线。以白酒酒醅样品宏基因组为模板进行实时荧光定量 PCR 特异性扩增, 获得相应的  $C_t$  值, 并根据标准曲线计算出酒醅中乳酸菌含量。

## 2 结果与分析

### 2.1 芝麻香型白酒发酵过程中乳酸菌群落的多样性分析

利用高通量测序技术对芝麻香型白酒发酵过程中的细菌群落结构进行分析, 28 个样品共获得 1 095 404 条有效序列, 平均每个样品 39 122 条有效序列, 其中与乳酸菌相关的有效序列 1 022 953 条。序列平均长度为 425 bp, 每个样本优质序列覆盖

率均高于 98%。大部分样品的稀释曲线趋于平稳(图 1), 说明测序结果能够较好地反映样品中乳酸菌群落多样性, 而 I-10 d 测序深度不够, 如果继续增大其测序量可能会获得更多的 OTU。

基于乳酸菌的 Shannon 指数、Chao1 指数, 对样品中乳酸菌群落结构的  $\alpha$  多样性进行分析, 以评价样品中乳酸菌的物种丰富度。由 Shannon 曲线(图 2A)和 Chao1 曲线(图 2B)可以看出, 窖池发酵前期(3、5、10 d)样品的 Shannon 曲线和 Chao1 曲线均高于堆积发酵和窖池发酵中后期的样品, 窖池发酵前期的物种丰富度较高。从整体上看, 在整个白酒酿造过程中, 乳酸菌的丰富度呈先上升再下降的趋势, 在窖池发酵的前期达到最大。

通过对 16S rRNA 基因测序结果进行比对分析, 发现在整个芝麻香型白酒发酵过程中厚壁菌门(Firmicutes)占细菌总量的 94%以上, 其中乳酸菌是发酵过程中的绝对优势细菌, 包括 *Weissella*、

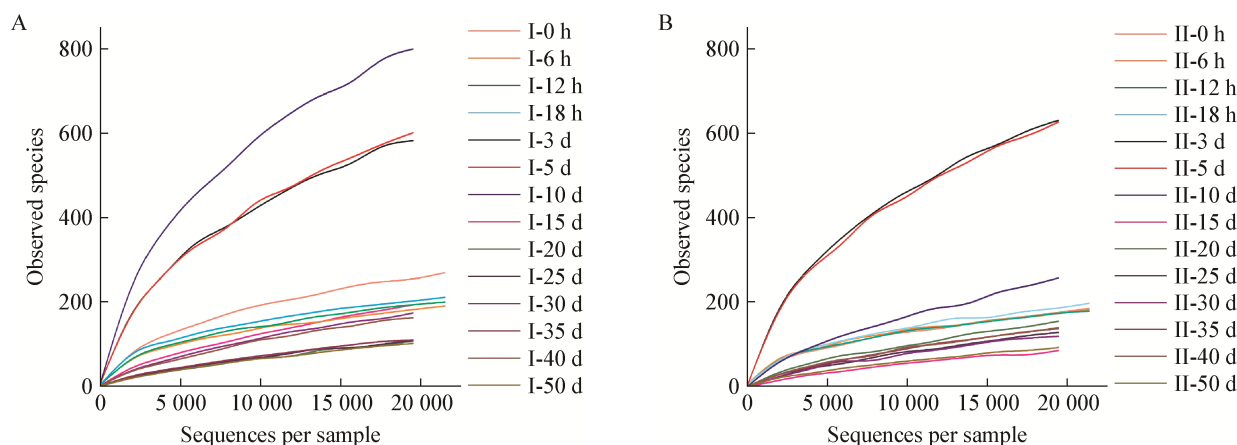


图 1 不同发酵时间样品稀释曲线

Figure 1 Rarefaction curve of samples in different fermentation time

注: A: 班组 I 酒醅样品的稀释曲线; B: 班组 II 酒醅样品的稀释曲线。I-0 h、I-6 h、I-12 h、I-18 h 分别为班组 I 堆积发酵 0、6、12、18 h 的酒醅样品; I-3 d、I-5 d、I-10 d、I-15 d、I-20 d、I-25 d、I-30 d、I-35 d、I-40 d、I-50 d: 班组 I 窖池发酵 3、5、10、15、20、25、30、35、40、50 d 的酒醅样品; II-0 h、II-6 h、II-12 h、II-18 h: 班组 II 堆积发酵 0、6、12、18 h 的酒醅样品; II-3 d、II-5 d、II-10 d、II-15 d、II-20 d、II-25 d、II-30 d、II-35 d、II-40 d、II-50 d: 班组 II 窖池发酵 3、5、10、15、20、25、30、35、40、50 d 的酒醅样品。

Note: A: Rarefaction curve of samples in group I; B: Rarefaction curve of samples in group II. I-0 h, I-6 h, I-12 h, I-18 h: Fermented grains at 0, 6, 12, 18 hours of heap-fermentation in group I, respectively; I-3 d, I-5 d, I-10 d, I-15 d, I-20 d, I-25 d, I-30 d, I-35 d, I-40 d, I-50 d: Fermented grains at 3, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 50 days of pit-fermentation in group I, respectively; II-0 h, II-6 h, II-12 h, II-18 h: Fermented grains at 0, 6, 12, 18 hours of heap-fermentation in group II, respectively; II-3 d, II-5 d, II-10 d, II-15 d, II-20 d, II-25 d, II-30 d, II-35 d, II-40 d, II-50 d: Fermented grains at 3, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 50 days of pit-fermentation in group II, respectively.

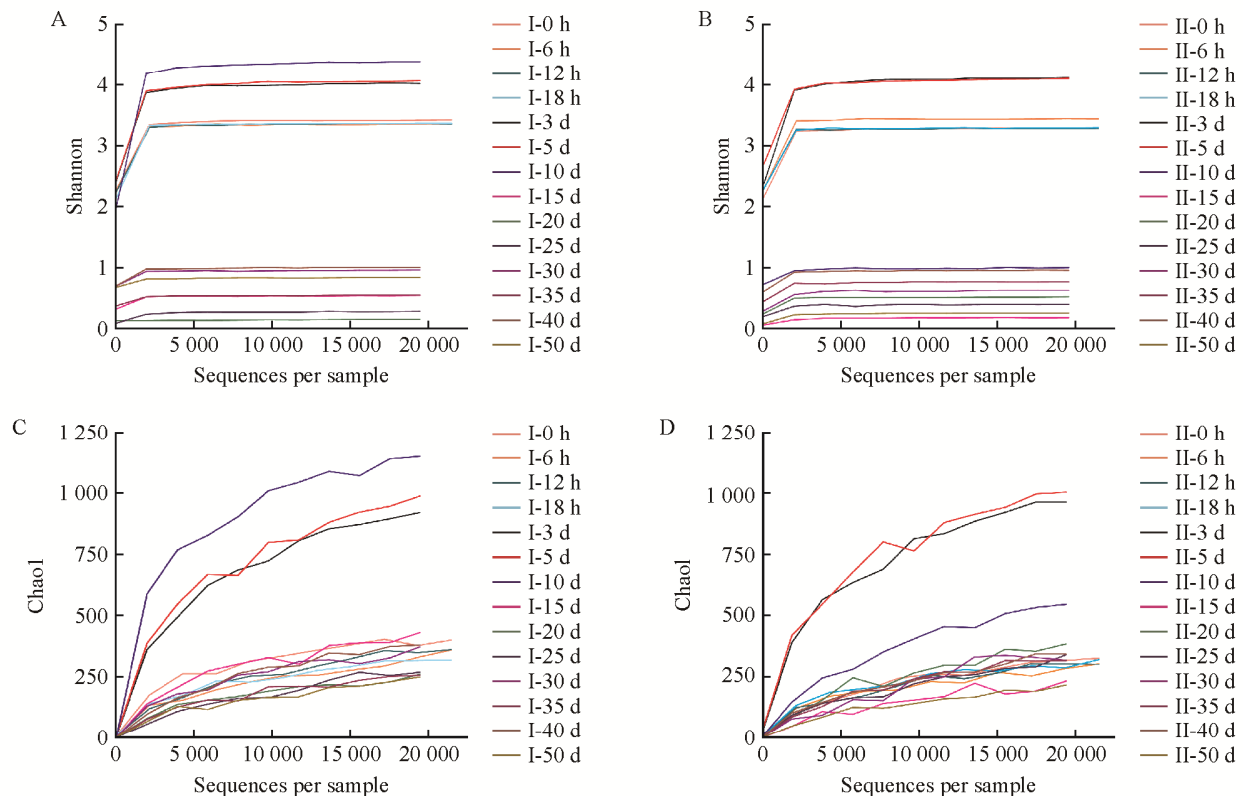


图 2 不同发酵时间样品 Shannon 指数和 Chao1 指数

Figure 2 Shannon index and Chao1 index of samples in different fermentation time

注: A: 班组 I 酒醅样品的 Shannon 指数; B: 班组 II 酒醅样品的 Shannon 指数; C: 班组 I 酒醅样品 Chao1 指数; D: 班组 II 酒醅样品 Chao1 指数。I-0 h、I-6 h、I-12 h、I-18 h: 班组 I 堆积发酵 0、6、12、18 h 的酒醅样品; I-3 d、I-5 d、I-10 d、I-15 d、I-20 d、I-25 d、I-30 d、I-35 d、I-40 d、I-50 d: 班组 I 窖池发酵 3、5、10、15、20、25、30、35、40、50 d 的酒醅样品; II-0 h、II-6 h、II-12 h、II-18 h: 班组 II 堆积发酵 0、6、12、18 h 的酒醅样品; II-3 d、II-5 d、II-10 d、II-15 d、II-20 d、II-25 d、II-30 d、II-35 d、II-40 d、II-50 d: 班组 II 窖池发酵 3、5、10、15、20、25、30、35、40、50 d 的酒醅样品。

Note: A: Shannon index of samples in group I; B: Shannon index of samples in group II; C: Chao1 index of samples in group I; D: Chao1 index of samples in group II. I-0 h, I-6 h, I-12 h, I-18 h: Fermented grains at 0, 6, 12, 18 hours of heap-fermentation in group I, respectively; I-3 d, I-5 d, I-10 d, I-15 d, I-20 d, I-25 d, I-30 d, I-35 d, I-40 d, I-50 d: Fermented grains at 3, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 50 days of pit-fermentation in group I, respectively; II-0 h, II-6 h, II-12 h, II-18 h: Fermented grains at 0, 6, 12, 18 hours of heap-fermentation in group II, respectively; II-3 d, II-5 d, II-10 d, II-15 d, II-20 d, II-25 d, II-30 d, II-35 d, II-40 d, II-50 d: Fermented grains at 3, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 50 days of pit-fermentation in group II, respectively.

*Pediococcus*、*Lactobacillus*、*Leuconostoc*、*Lactococcus* 等 5 个属, 共计 43 种乳酸菌(表 1), 占细菌总量的 83.25%以上, 其中 *Lactobacillus* 属的乳酸菌种类最多, 有 31 种, 远多于 DGGE 得到的乳酸菌种类<sup>[19]</sup>。

选取所有样品中平均相对丰度大于 0.5% 的 OTU 序列与 NCBI 数据库中模式菌的 16S rRNA 基因序列进行比对, 采用邻接法(Neighbor-Joining)建构系统发育树(图 3)。其中, denovo2114 序列与 NCBI 数据库中的模式菌 *Lactobacillus suebicus*

LC071852.1 的相似度最大, 但也只有 92%, 因此极有可能是一种新的乳酸菌(*Lactobacillus* sp.)。通过比对发现, 在发酵过程中主要的乳酸菌有 10 种, 分别是 *Weissella paramesenteroides*、*Weissella cibaria*、*Weissella confuse*、*Pediococcus pentosaceus*、*Leuconostoc pseudomesenteroides*、*Lactobacillus fermentum*、*Lactobacillus plantarum*、*Lactobacillus paracasei*、*Lactobacillus acetotolerans* 和 *Lactobacillus* sp.。

表 1 芝麻香型白酒发酵过程中乳酸菌种类

Table 1 Lactic acid bacteria species during sesame-flavor liquor fermentation process

乳酸菌(属水平)	相似种属	GenBank 登录号	相似度
Lactic acid bacteria (genus)	Similar strains	GenBank accession number	Similarity degree (%)
<i>Lactobacillus</i>	<i>Lactobacillus suebicus</i>	LC071852.1	92
	<i>Lactobacillus acetotolerans</i>	LC071813.1	100
	<i>Lactobacillus pontis</i>	LC145562.1	99
	<i>Lactobacillus paralimentarius</i>	LC096230.1	99
	<i>Lactobacillus plantarum</i>	LC064896.1	100
	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	LC145553.1	96
	<i>Lactobacillus curvatus</i>	LC063167.1	100
	<i>Lactobacillus brevis</i>	LC062897.1	100
	<i>Lactobacillus concavus</i>	NR_043105.1	92
	<i>Lactobacillus buchneri</i>	LC064887.1	100
	<i>Lactobacillus reuteri</i>	LC145550.1	100
	<i>Lactobacillus sanfranciscensis</i>	NR_117814.1	100
	<i>Lactobacillus acidipiscis</i>	LC145575.1	100
	<i>Lactobacillus xiangfangensis</i>	AB907194.1	97
	<i>Lactobacillus intestinalis</i>	LC096206.1	100
	<i>Lactobacillus fermentum</i>	LC065036.1	100
	<i>Lactobacillus vaccinostrercus</i>	LC071823.1	96
	<i>Lactobacillus paracasei</i>	LC096209.1	100
	<i>Lactobacillus taiwanensis</i>	NR_044507.1	100
	<i>Lactobacillus agilis</i>	LC065041.1	100
	<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	NR_113387.1	100
	<i>Lactobacillus panis</i>	LC145560.1	99
	<i>Lactobacillus coryniformis</i>	LC065033.1	100
	<i>Lactobacillus pantheris</i>	NR_025189.1	100
	<i>Lactobacillus oryzae</i>	NR_114339.1	100
	<i>Lactobacillus mucosae</i>	NR_024994.1	100
	<i>Lactobacillus rossiae</i>	LC071853.1	100
	<i>Lactobacillus pentosus</i>	LC071808.1	99
	<i>Lactobacillus pobuzihii</i>	NR_112694.1	97
	<i>Lactobacillus amylovorus</i>	LC064891.1	100
	<i>Lactobacillus dextrinicus</i>	LC071836.1	100
<i>Weissella</i>	<i>Weissella paramesenteroides</i>	LC096224.1	99
	<i>Weissella confuse</i>	LC063164.1	99
	<i>Weissella hellenica</i>	LC096226.1	97
	<i>Weissella cibaria</i>	LC096236.1	100
<i>Pediococcus</i>	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	LC071837.1	100
	<i>Pediococcus acidilactici</i>	NR_042057.1	97
<i>Leuconostoc</i>	<i>Leuconostoc pseudomesenteroides</i>	LC096220.1	99
	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	LC097081.1	91
	<i>Leuconostoc citreum</i>	LC096222.1	99
	<i>Leuconostoc lactis</i>	LC071838.1	100
<i>Lactococcus</i>	<i>Lactococcus taiwanensis</i>	NR_114327.1	99
	<i>Lactococcus garvieae</i>	LC145570.1	100

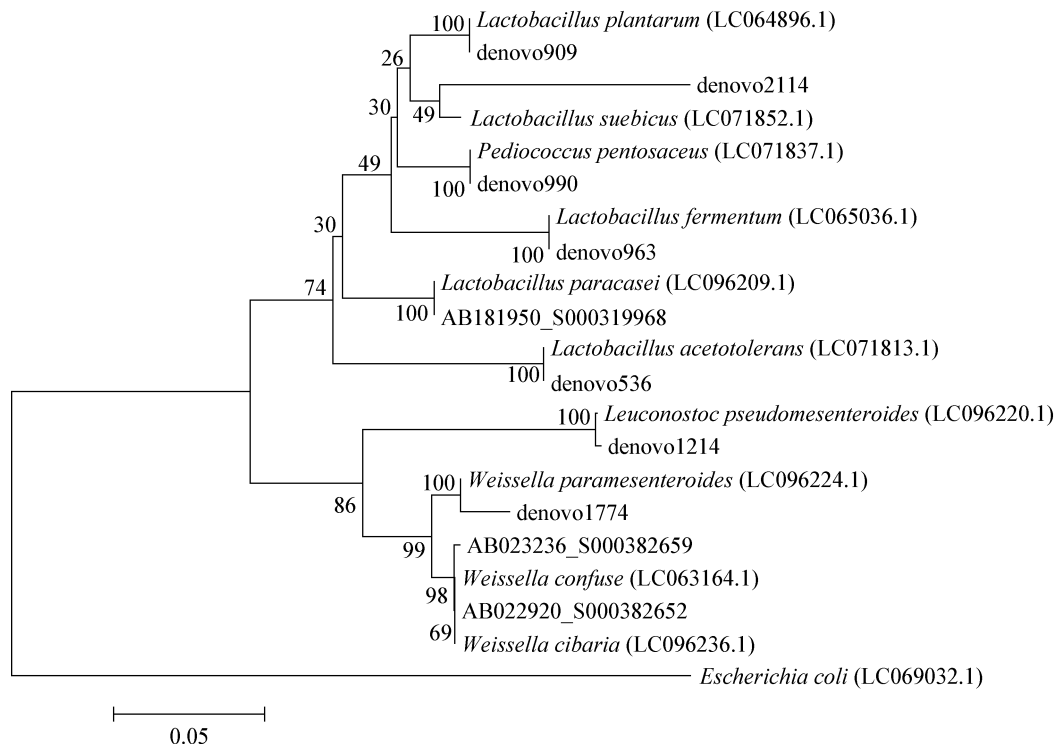


图3 芝麻香型白酒发酵过程中乳酸菌的系统发育树

Figure 3 Phylogenetic tree of lactic acid bacteria during sesame-flavor liquor fermentation process

注: 括号内为 GenBank 登录号; 分支上的数字为 1 000 次重复后获得的置信值; 标尺表示 100 个核苷酸中有 5 个被替换。

Note: Numbers in parentheses are GenBank accession numbers; Numbers at the branches are bootstrap values obtained after 1 000 replicates; The scale bar represent 5 substitutions per 100 nucleotide positions.

芝麻香型白酒发酵过程的乳酸菌既有同型发酵乳酸菌如 *Lactobacillus acetotolerans*<sup>[20]</sup>, 也有异型发酵乳酸菌如 *Lactobacillus fermentum*、*Leuconostoc mesenteroides* 等<sup>[21]</sup>。乳酸菌同型发酵的产物主要是乳酸, 异型发酵除了乳酸之外, 还产生乙酸<sup>[22]</sup>。乳酸菌代谢产生的乳酸、乙酸等有机酸既可以直接影响白酒风味的形成, 还能够以其为底物产生乳酸乙酯、乙酸乙酯等酯类物质影响白酒风味。除此以外, 乳酸菌还具有调节菌群结构和调控发酵进程的作用。一方面, 乳酸菌能够对其他酿造微生物的生长产生影响, 从而调节发酵过程中的菌群结构。*Lactobacillus buchneri* 抑制 *Bacillus licheniformis*、*Bacillus subtilis*、*Bacillus amyloliquefaciens* 等细菌的生长<sup>[18]</sup>; *Lactobacillus plantarum*、*Lactobacillus coryniformis*、*Pediococcus pentosaceus* 等乳酸菌对霉菌的生长也存在抑制作

用<sup>[5]</sup>; 乳酸菌对其他酿造微生物除了有抑制作用以外, 还能够通过乳糖酶将乳糖分解为葡萄糖和半乳糖, 为酵母生长提供碳源<sup>[23]</sup>。另一方面, 乳酸菌直接调控发酵过程, 例如 *Weissella* 属和 *Leuconostoc* 属能够启动发酵, *Lactobacillus plantarum* 能够加速发酵进程<sup>[24-25]</sup>。

## 2.2 芝麻香型白酒发酵过程中乳酸菌群落的演替规律分析

堆积发酵阶段 *Weissella* 属占细菌总量的 50% 以上, 其次是 *Pediococcus* 属和 *Lactobacillus* 属, 而 *Leuconostoc* 属和 *Lactococcus* 属相对较少(图4)。堆积开始时, *Weissella paramesenteroides* (23.42%)、*Weissella cibaria* (21.81%)、*Weissella confuse* (14.63%) 占优势, 还有少量的其他乳酸菌, 如 *Pediococcus pentosaceus* (8.65%)、*Lactobacillus fermentum* (8.70%)、*Lactobacillus plantarum* (1.85%)、



*Lactobacillus paracasei* (6.05%)、*Lactobacillus* sp. (0.03%)、*Leuconostoc pseudomesenteroides* (0.79%) (图 4)。在堆积发酵过程中,乳酸菌的相对丰度略有波动。堆积结束时, *Weissella paramesenteroides* (29.49%)、*Pediococcus pentosaceus* (13.42%)、*Lactobacillus plantarum* (3.23%)、*Lactobacillus paracasei* (7.43%)、*Leuconostoc pseudomesenteroides* (1.25%) 相对丰度上升,而 *Weissella cibaria* (15.07%)、*Weissella confusa* (10.95%)、*Lactobacillus fermentum* (4.93%)略有下降(图 4)。堆积发酵过程中 *Lactobacillus* sp.、*Lactobacillus acetotolerans* 相对丰度极低且变化不大。

进入窖池发酵阶段后,尤其是发酵 5 d 后,酒醅中 *Weissella paramesenteroides*、*Weissella cibaria* (未检测到)、*Weissella confusa*、*Pediococcus pentosaceus*、*Lactobacillus fermentum*、*Lactobacillus plantarum*、*Lactobacillus paracasei*、*Leuconostoc pseudomesenteroides* 的相对丰度下降(图 4)。当发

酵 15 d 时,发酵前期的这些乳酸菌的相对丰度均降至 1%以下,而 *Lactobacillus* sp.成为主要细菌(97.51%)(图 4)。在窖池发酵中后期, *Lactobacillus* sp.占绝对优势地位,相对丰度达 80%以上,还存在少量 *Lactobacillus acetotolerans* (图 4)。

乳酸菌定量分析的标准曲线如图 5A 所示,  $y = -3.081 \ln x + 34.197$ , 扩增效率为 99.46%, 检测范围为  $3.03 \times 10^3 - 3.03 \times 10^8$  个/g 酒醅。堆积过程中,乳酸菌总量几乎不变,而在窖池发酵阶段,乳酸菌从 5 d 开始增长,在 30 d 达到最大值,30 d 以后开始下降。结合高通量测序结果可以看出,在堆积过程和窖池发酵前期,尽管乳酸菌的菌群结构略有变化,但其总量变化不大。然而随着发酵的进行,环境逐渐更适合 *Lactobacillus acetotolerans*、*Lactobacillus* sp. 的生长,因此, *Lactobacillus acetotolerans*、*Lactobacillus* sp.开始大量增长。但是在窖池发酵后期,可能由于营养物质的逐渐消耗,乳酸菌的生长受到限制,出现下降趋势。

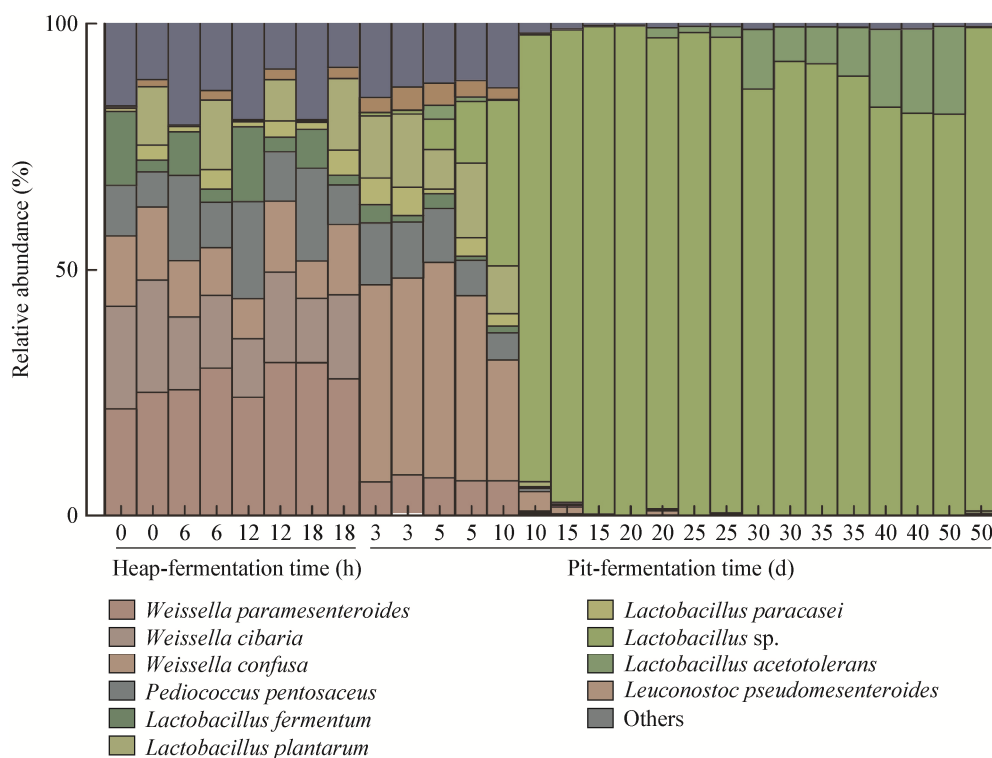


图 4 芝麻香型白酒发酵过程中乳酸菌在细菌中所占的比例

Figure 4 The proportion of lactic acid bacteria in bacteria during sesame-flavor liquor fermentation process



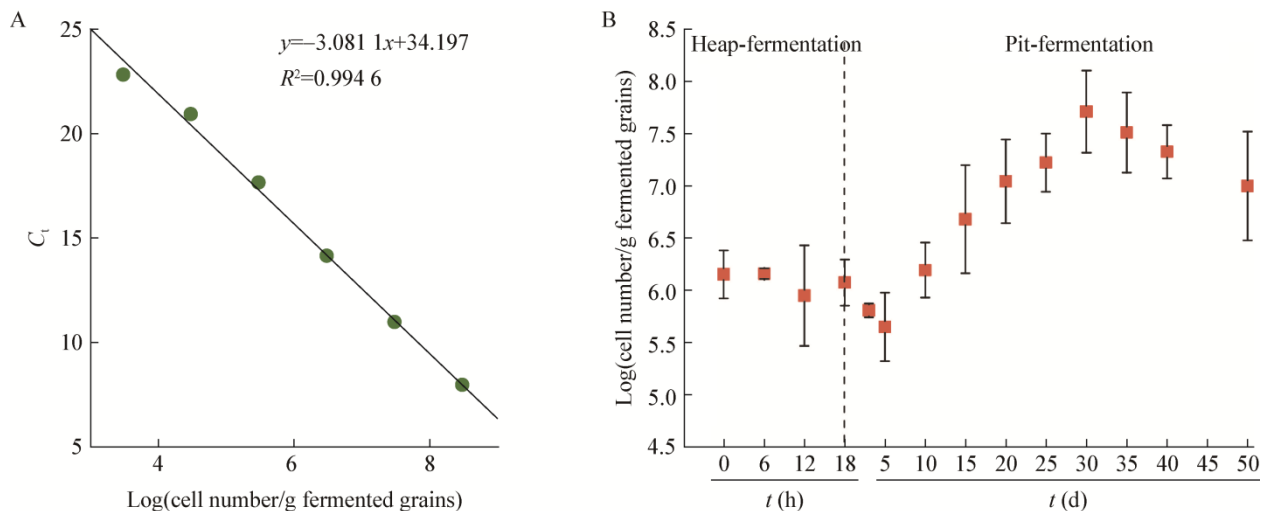


图5 乳酸菌定量分析的标准曲线(A)和芝麻香型白酒发酵过程中乳酸菌定量结果(B)

Figure 5 The standard curve for quantitative analyzing lactic acid bacteria (A) and the quantitative results during sesame-flavor liquor fermentation process (B)

堆积发酵和窖池发酵前期出现的 *Weissella*、*Pediococcus* 属和部分 *Lactobacillus* 属的乳酸菌快速产生乳酸、乙酸等有机酸,能够降低发酵体系的pH,从而抑制杂菌生长,代谢产生的二氧化碳则有助于维持发酵体系的厌氧环境,为后期乳酸菌的生长创造了有利的环境<sup>[26]</sup>。然而,随着发酵的进行,白酒发酵体系的酸度、乙醇浓度增加,含氧量降低,这些乳酸菌的生长受到了抑制而逐渐衰亡,直到消失,继而出现更耐酸、耐高浓度乙醇、耐低含氧量的乳酸菌完成后续发酵过程。在过去的研究中,由于分析手段的局限,认为 *Lactobacillus acetotolerans* 是窖池发酵过程中的绝对优势细菌<sup>[14]</sup>。但是通过高通量测序手段发现乳酸菌 *Lactobacillus* sp.才是窖池发酵中后期的优势细菌, *Lactobacillus* sp.的生长代谢可能对白酒酿造过程有重要影响。

### 3 结论

本研究通过高通量测序,深入分析了芝麻香型白酒发酵过程中的乳酸菌菌群多样性及其演替规律,并利用实时荧光定量PCR对发酵过程中乳酸菌的生物量进行定量,从菌群结构变化方面阐述了芝麻香型白酒发酵过程中乳酸菌动态。结果显示,乳酸菌是芝麻香型白酒发酵过程中的优势菌群,占

细菌总量的83.25%以上。乳酸菌种类丰富,涉及 *Weissella*、*Pediococcus*、*Lactobacillus*、*Leuconostoc*、*Lactococcus* 等5个属,共计43种。其中, *Weissella* 属是堆积发酵过程中的主要细菌,而在窖池发酵阶段 *Lactobacillus* 属占主导地位。在堆积发酵阶段和窖池发酵前期,乳酸菌总量变化不大。随着发酵的继续, *Weissella* 属、*Pediococcus* 属等乳酸菌逐渐衰亡,而 *Lactobacillus* sp.大量生长,成为窖池发酵中后期的绝对优势细菌。但是目前仍不清楚 *Lactobacillus* sp.等乳酸菌对于白酒酿造过程的影响。因此,后续将在乳酸菌多样性和演替规律的基础上,进一步结合可培养实验对发酵过程中乳酸菌的功能进行研究,为更好地探索白酒酿造机理和控制白酒品质提供生物学依据。

### REFERENCES

- [1] Liu SN, Han Y, Zhou ZJ. Lactic acid bacteria in traditional fermented Chinese foods[J]. Food Research International, 2011, 44(3): 643-651
- [2] Wu ZF, Zhuang BW, Weng PF, et al. Fermentation quality characteristics and flavor formation changes during the process of pickled wax gourd in eastern Zhejiang[J]. International Journal of Food Properties, 2016, 19(2): 409-419
- [3] le Lay C, Coton E, le Blay G, et al. Identification and quantification of antifungal compounds produced by lactic acid bacteria and propionibacteria[J]. International Journal of Food Microbiology, 2016, 239: 79-85

- [4] Gerez CL, Torres MJ, de Valdez GF, et al. Control of spoilage fungi by lactic acid bacteria[J]. *Biological Control*, 2013, 64(3): 231-237
- [5] Magnusson J, Ström K, Roos S, et al. Broad and complex antifungal activity among environmental isolates of lactic acid bacteria[J]. *FEMS Microbiology Letters*, 2003, 219(1): 129-135
- [6] Dalié DKD, Deschamps AM, Richard-Forget F. Lactic acid bacteria-potential for control of mould growth and mycotoxins: a review[J]. *Food Control*, 2010, 21(4): 370-380
- [7] Wu Q, Chen LQ, Xu Y. Yeast community associated with the solid state fermentation of traditional Chinese *Maotai*-flavor liquor[J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2013, 166(2): 323-330
- [8] Wu LL, Wang HY, Xu Y, et al. Differences of lactic acid bacteria community between soy sauce aroma style and light aroma style liquor fermentation[J]. *Microbiology China*, 2013, 40(12): 2182-2188 (in Chinese)  
吴莉莉, 王海燕, 徐岩, 等. 酱香型与清香型白酒发酵过程中乳酸菌菌群的差异性分析[J]. *微生物学通报*, 2013, 40(12): 2182-2188
- [9] Qi YM. Investigation on sesame-flavor liquor production[J]. *Liquor-making Science & Technology*, 2009(8): 140-142 (in Chinese)  
戚元民. 对芝麻香型白酒生产的认识[J]. *酿酒科技*, 2009(8): 140-142
- [10] Liu MM, Wang JG, Sun PP, et al. Application of bran starter in the production of sesame-flavor liquor[J]. *Liquor-making Science & Technology*, 2013(3): 69-70,74 (in Chinese)  
刘明明, 王君高, 孙朋朋, 等. 麸曲在芝麻香型白酒生产中的应用[J]. *酿酒科技*, 2013(3): 69-70,74
- [11] Zhang B. Production and application of distiller's yeast used especially for the production of sesame-flavor liquor[J]. *Liquor Making*, 2012, 39(6): 38-41 (in Chinese)  
张彬. 芝麻香型白酒专用曲的生产及应用[J]. *酿酒*, 2012, 39(6): 38-41
- [12] 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
- [13] Xu ZJ. Analysis of brewing microbiology diversity of the sesame-flavor liquor[D]. Hangzhou: Master's Thesis of Zhejiang Sci-Tech University, 2012 (in Chinese)  
徐泽江. 芝麻香型白酒酿造微生物多样性分析[D]. 杭州: 浙江理工大学硕士学位论文, 2012
- [14] 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
- [15] de Pasquale I, di Cagno R, Buchin S, et al. 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
- [16] Michel E, Monfort C, Deffrasnes M, et al. Characterization of relative abundance of lactic acid bacteria species in French organic sourdough by cultural, qPCR and MiSeq high-throughput sequencing methods[J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2016, 239: 35-43
- [17] Zhang XL, Tian XQ, Ma LY, et al. Biodiversity of the symbiotic bacteria associated with toxic marine dinoflagellate *Alexandrium tamarense*[J]. *Journal of Biosciences and Medicines*, 2015, 3(6): 23-28
- [18] Zhang Y. Community structures and functions of lactic acid bacteria during *Maotai*-flavor liquor fermentation[D]. Wuxi: Master's Thesis of Jiangnan University, 2015 (in Chinese)  
张艳. 酱香型白酒发酵中乳酸菌群结构及功能研究[D]. 无锡: 江南大学硕士学位论文, 2015
- [19] 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
- [20] Toh H, Morita H, Tsuji H, et al. Complete genome sequence of *Lactobacillus acetotolerans* RIB 9124 (NBRC 13120) isolated from putrefied (hiochi) Japanese sake[J]. *Journal of Biotechnology*, 2015, 214: 214-215
- [21] Basso TO, Gomes FS, Lopes ML, et al. Homo- and heterofermentative lactobacilli differently affect sugarcane-based fuel ethanol fermentation[J]. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 2014, 105(1): 169-177
- [22] Blandino A, Al-Aseeri ME, Pandiella SS, et al. Cereal-based fermented foods and beverages[J]. *Food Research International*, 2003, 36(6): 527-543
- [23] Sudun, Wulijideligen, Arakawa K, et al. Interaction between lactic acid bacteria and yeasts in airag, an alcoholic fermented milk[J]. *Animal Science Journal*, 2013, 84(1): 66-74
- [24] Lee ME, Jang JY, Lee JH, et al. Starter cultures for kimchi fermentation[J]. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2015, 25(5): 559-568
- [25] Jung JY, Lee SH, Jeon CO. Kimchi microflora: history, current status, and perspectives for industrial kimchi production[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2014, 98(6): 2385-2393
- [26] Zhu KL. Research on screening, high cell density cultivation and mixture of lactic acid bacteria for pickle fermentation[D]. Wuxi: Master's Thesis of Jiangnan University, 2014 (in Chinese)  
朱孔亮. 泡菜用乳酸菌的筛选、高密度培养及菌剂配方的研究[D]. 无锡: 江南大学硕士学位论文, 2014