田瑞杰,张勇,冯大鸿,等. 基于宏转录组学的浓香型白酒酒醅活性微生物群落空间异质性研究[J]. 轻工学报,2022,37(1):1-11.
TIAN R J,ZHANG Y,FENG D H,et al. Study on spatial heterogeneity of active microbial community in strong-flavor Baijiu fermented grains based on metatranscriptome[J]. Journal of Light Industry,2022,37(1):1-11.
DOI:10.12187/2022.01.001

基于宏转录组学的浓香型白酒酒醅活性微生物群落空间异质性研究

田瑞杰[1],张勇[1],冯大鸿[1],王康丽[1],迟雷[1],沈祥坤[2],胡晓龙[1],何培新[1]

1. 郑州轻工业大学 食品与生物工程学院,河南 郑州 450001;
2. 河南省食品工业科学研究所有限公司,河南 郑州 450053

摘要: 采用宏转录组学技术,对浓香型白酒酒醅中具有生理活性的细菌和真菌群落在窖池不同空间位置上的组成及差异表达基因进行研究。结果表明:细菌群落共检测到87个门、78个纲、165个目、396个科、1612个属和7234个种,真菌群落共检测到8个门、26个纲、58个目、127个科、223个属和394个种,且酒醅上、中、下层之间的活性微生物数目差异较小;各层酒醅中的细菌和真菌群落组成无明显差异,均以厚壁菌门和子囊菌门为主要优势细菌门和真菌门,以芽孢杆菌纲和酵母纲为主要优势细菌纲和真菌纲,以乳杆菌属为主要优势细菌属,以酵母菌属(上层和下层)或 *Scheffersomyces*(中层)为主要优势真菌属;下层与中层酒醅、中层与上层酒醅之间的差异表达基因数量较多,分别为90个和67个,且主要富集在RNA降解和糖酵解/糖异生通路上,而各层酒醅之间的差异表达基因的功能大部分为代谢活动;整体上,中层酒醅中的活性微生物菌群对RNA降解的影响最低,下层酒醅中的活性微生物菌群在代谢活动上的贡献最大。

关键词: 浓香型白酒酒醅;宏转录组学;活性微生物群落;空间异质性
中图分类号: TS261.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 2096-1553(2022)01-0001-11

0 引言

浓香型白酒作为中国传统蒸馏酒的典型代表,以其独特的自然固态发酵工艺和典型的酒体风味特征而享有盛名[1]。酒醅主要是指处于整个固态发酵过程中的多种物料混合物,是白酒酿造微生物进行固态发酵的主要载体和白酒风味物质的直接来源。酒醅微生物(细菌、霉菌、酵母菌、产甲烷菌、乳酸菌等)主要来自酒曲、窖泥、操作工具、车间环境等[2-3],它们在窖池内经过一系列复杂的生化反应和能量代谢,形成多样的风味物质(有机酸、醇类、酯类等)[3-4]。

近年来,基于DNA水平的免培养技术(DNA序列同源分析、PCR-DGGE(聚合酶链反应-变性梯度凝胶电泳)、克隆文库、二代测序等)已广泛应用于白酒酒醅微生物群落结构的解析[5-15],浓香型白酒酒醅微生物群落的结构和多样性特征逐渐清晰。例如,乳杆菌属、芽孢杆菌属、片球菌属、地芽孢杆菌属等是酒醅中的优势细菌属[5,11,13-14],*Kazachstania*、

收稿日期: 2021-06-02
基金项目: 国家自然科学基金项目(31801535);三门峡市引进高层次人才(团队)创新创业项目(2020111);河南省"科创中原"科技经济融合行动项目(2021)
作者简介: 田瑞杰(1996—),女,河南省民权县人,郑州轻工业大学硕士研究生,主要研究方向为白酒酿造。E-mail:1053310426@qq.com
通信作者: 胡晓龙(1984—),男,河南省杞县人,郑州轻工业大学副教授,博士,主要研究方向为白酒酿造。E-mail:huxiaolong188@126.com

Thermoascus、*Issatchenkia* 等是酒醅中的优势真菌属[8,12,15]。但上述基于 DNA 水平方法检测到的微生物大部分处于死亡或休眠状态,不能准确反映浓香型白酒发酵过程中真正有贡献的活性微生物[1,16-17]。与基于 DNA 水平的技术相比,基于 RNA 水平的宏转录组学技术能深入了解差异表达基因(DEG),准确揭示目标环境样品中的活性微生物群落,以及与风味物质合成相关的功能微生物及其代谢途径,目前已广泛应用于土壤、海洋、湖泊等生态环境[18]及豆酱、奶酪、泡菜、白酒等发酵食品的微生物研究中[19]。例如,Z. W. Song 等[7]利用宏转录组学技术分析发现,酵母菌(酿酒酵母属、毕赤酵母属、裂殖酵母属和接合酵母属)和乳酸菌(乳杆菌属)中的丙酮酸代谢活动在酱香型白酒风味成分的产生中分为两个阶段:第一阶段为乙醇合成,裂殖酵母属是核心功能微生物;第二阶段为乳酸和乙酸合成,乳杆菌属是核心功能微生物。因此,采用宏转录组学技术研究浓香型白酒酒醅中的活性微生物群落结构、代谢反应和功能特征,有助于进一步揭示其固态发酵机制和风味物质合成途径的重要环节。

窖池中不同层次酒醅的物料配比、与黄水和窖泥的接触程度及发酵后期理化性质的变化均会造成酒醅微生物群落的空间异质性[5,20-21]。例如,胡晓龙等[5]采用 16S rRNA 基因测序技术对发酵过程中不同空间位置的浓香型白酒酒醅细菌群落进行解析后发现,具有相同发酵节点的窖池中层,酒醅细菌群落的多样性高于上层和下层。吕辉等[22]研究发现,不同空间位置的酒醅微生物生长情况不一样,具体表现为上层酒醅细菌数量最多,下层酒醅酵母菌数量最多。而不同层次酒醅微生物群落的结构差异会导致不同层次酒醅的风味代谢物产生差异[23]。此外,25 d 左右是白酒发酵过程中的重要时间节点,此时主发酵期结束,进入酯化阶段,部分酒精在酯化反应中合成生香物质,使产酒下降、生香增多[24-25]。目前,对该发酵节点浓香型白酒酒醅中的活性微生物群落的结构、差异表达基因、代谢功能的空间异质性研究未见报道。

基于此,本研究拟采用宏转录组学技术,以主发酵期结束后的第 25 d 作为时间节点,选取浓香型白酒生产窖池的上、中、下层不同空间位置的酒醅作为研究对象,深入揭示酒醅中具有生理活性的细菌和真菌群落在窖池不同空间位置的组成及差异表达基因,以期为进一步了解浓香型白酒整个发酵过程中的酒醅活性微生物群落的演替规律、代谢功能、发酵机理等提供理论依据。

1　材料和方法

1.1　材料与试剂

实验样品:酒醅样品,取自河南省某浓香型白酒企业生产车间。

实验试剂:十二烷基硫酸钠(SDS),上海百赛生物技术股份有限公司产;β-巯基乙醇、异戊醇、聚乙二醇(PEG)、焦碳酸二乙酯(DEPC),上海麦克林生化科技有限公司产;水饱和酚(pH 值为 4.5),上海源叶生物科技有限公司产;无水乙醇,天津市富宇精细化工有限公司产;三羟甲基氨基甲烷(Tris)、聚乙烯吡咯烷酮(PVP)、RNase-Free Water、2×Taq Master Mix、2000 Marker、6×loading buffer,北京索莱宝科技有限公司产;$MgCl_2$、NaCl、$CaCl_2$、草酸钠、NaH_2PO_3、Na_2HPO_3、乙二胺四乙酸二钠,北京北化精细化学品有限责任公司产。以上化学试剂均为分析纯。

1.2　主要仪器与设备

MP200A 型精密电子天平,上海良丰仪器仪表有限公司产;TGL-20M 型高速离心机,上海卢湘仪离心机仪器有限公司产;Mixer4K 微型涡旋混合仪,生工生物工程(上海)股份有限公司产;85-2 型恒温磁力搅拌器,江苏金坛市中大仪器厂产;IMS-40 型全自动雪花制冰机,常熟市雪科电器有限公产;LDZX-50KBS 型立式压力蒸汽灭菌器,上海中安医疗器械厂产;SW-CJ-1 型超净工作台,苏州净化设备有限公司产;DYY-8C 型电泳仪、WD-9403C 型紫外仪,北京六一生物科技有限公司产;NanoDrop2000 型微量分光光度计,赛默飞世尔科技公司产;移液枪,上海大龙公司产。

1.3　实验方法

1.3.1　酒醅样品采集　以发酵时间为 25 d 的浓香型白酒酒醅为研究对象,分别在 3 个不同窖池的上、中、下层位置各取样 50 g,将 3 个窖池的同一层酒醅

样品混合后得到该层的代表样品,将其放入无菌袋并置于盛有干冰的泡沫箱中,立即带回实验室进行总 RNA 提取。上、中、下层的代表样品分别编号为 T25、M25、B25。

1.3.2 宏转录组测序 首先,按照文献[26]中的 SDS-苯酚法对酒醅进行总 RNA 提取;然后,采用 1%琼脂糖凝胶电泳和微量分光光度计评估总 RNA 的质量浓度、纯度和完整性;最后,选择高质量的 RNA 样本构建 Illumina 测序文库。宏转录组测序在北京奥维森科技有限公司的 Illumina Hiseq 2500 平台上完成。

1.3.3 宏转录组数据分析 过滤测序获得的原始序列,剔除带有测序接头、未知碱基含量大于 1%和低质量碱基($Q \leqslant 20$)含量大于 50%的序列得到质控后序列,利用 Diamond 软件将其与 NR 数据库进行比对分析,并利用 Megan 软件进行微生物分类学解析。在物种分类结果中,挑选属于细菌界和真菌界的微生物,并对其门、纲、属水平上微生物的丰度进行换算后,以属水平数据为基础,按照公式①计算所有酒醅样品中细菌界和真菌界的活性微生物群落的多样性指数(Shannon 指数)。柱状图和热图分别采用 Origin 和 Heml 软件进行绘制。

$$H = -\sum_{i=1}^{s} P_i \times \ln(P_i) \qquad ①$$

式中,H 为 Shannon 指数,s 为微生物属总数,P_i 为第 i 个属的数量占总数的比例。

采用 Trinity(v0.27)软件对质控后序列进行拼接,以拼接后得到的转录组作为参考序列(ref),采用 RSEM 软件[26]将每个样品的质控后序列对 ref 做映射,得到每个样品比对每个基因的序列数目,并对其进行 FPKM(每百万片段中来自某一基因每千碱基长度的片段数目)转换,进而分析基因的表达水平。使用统计软件 R 中的 edgeR 包和 DESeq2 包,分析不同样品间表达有差异的基因,并使用火山图对其分布情况进行分析,阈值设定为:$|\log_2(\text{fold change})|>1$ 且 $q<0.05$。使用 KOBAS(2.0)软件,设置参数--fdr 为 BH(即使用 BH 校正)对差异表达基因进行 KEGG 代谢通路富集分析,结果以散点图形式展现。

2 结果与讨论

2.1 测序数据结果统计分析

经宏转录组测序及质量控制后,3 个样品共获得 33.1 G 的碱基,各个样品双端测序后的序列获得率均在 99%以上,平均测序错误率≤0.03%,且 Phred 质量值分别大于 20 和 30 的碱基数占总碱基数的比例(Q_{20}、Q_{30})均大于 93.59%(见表 1),表明测序数据质量可靠,可用于下一步分析。此外,由于普通的转录组测序文库中 Read1 和 Read2 会以相等的概率取自基因的正反链,所以 Read1 和 Read2 上的鸟嘌呤(G)和胞嘧啶(C)分布倾向于等比例。在本研究测序数据中,同一样品双端测序所得的 Read1 和 Read2 数据中 G 与 C 的数量和占总碱基数的比例相差较小,即测序数据没有出现明显的 G 和 C 分离,表明测序质量较好,有利于下一步的数据分析。

2.2 各层酒醅中的活性微生物群落的组成分析

将质控后序列与 NR 数据库进行比对分析后,各层酒醅样品中具有转录活性的细菌和真菌群落在不同分类水平上的微生物数目及物种多样性结果如表 2 和表 3 所示。由表 2 和表 3 可知,所有酒醅样品中,细菌群落共检测到 87 个门、78 个纲、165 个目、396 个科、1612 个属和 7234 个种,真菌群落共检

表 1 测序数据统计

Table 1 Sequencing data statistics

样品	原始序列/条	质控后序列/条	质控后碱基/G	错误率/%	Q_{20}/%	Q_{30}/%	GC 比例/%
B25_1	36 922 375	36 606 933	5.49	0.02	98.76	96.15	42.14
B25_2	36 922 375	36 606 933	5.49	0.0	98.25	94.75	41.71
M25_1	38 594 454	38 449 472	5.77	0.02	98.71	95.88	41.77
M25_2	38 594 454	38 449 472	5.77	0.02	98.16	94.29	41.38
T25_1	35 489 718	35 268 096	5.29	0.02	98.77	96.14	42.05
T25_2	35 489 718	35 268 096	5.29	0.03	97.81	93.59	41.60

注:样品编号后的_1、_2 分别代表 Read1、Read2。

表2　各层酒醅样品中细菌群落在不同分类水平上的微生物数目及物种多样性结果

Table 2　The number of microorganisms and species diversity of the bacterial communities in each layer of fermented grains samples at different taxonomic levels

样品	Shannon指数	门/个	纲/个	目/个	科/个	属/个	种/个
B25	1.089	84	75	158	377	1461	5852
M25	1.035	83	77	160	376	1432	5436
T25	1.145	85	77	163	377	1441	5409
总和	—	87	78	165	396	1612	7234

表3　各层酒醅样品中真菌群落在不同分类水平上的微生物数目及物种多样性结果

Table 3　The number of microorganisms and species diversity of the fungal communities in each layer of fermented grains samples at different taxonomic levels

样品	Shannon指数	门/个	纲/个	目/个	科/个	属/个	种/个
B25	2.829	8	25	54	114	188	326
M25	2.926	7	26	54	108	177	273
T25	2.719	6	23	49	100	162	249
总和	—	8	26	58	127	223	394

测到8个门、26个纲、58个目、127个科、223个属和394个种，真菌数量明显低于细菌数量。本研究是从RNA水平揭示浓香型白酒酒醅中的活性微生物群落的分类情况，因此细菌属(1612个)和真菌属(223个)的数量远高于已报道酒醅中细菌属(496个)和真菌属(155个)的数量[12-13]。此外，不同层酒醅之间的活性微生物数目差异较小，下层酒醅的细菌数目在属和种两个水平上高于上层和中层，在其他水平上低于其余两层；真菌数目则是下层略高于其余两层。在微生物多样性方面，上层酒醅的细菌物种多样性最高，中层的最低；真菌物种多样性则是中层最高，上层最低，且真菌群落的物种多样性明显高于细菌群落。胡晓龙等[5]通过16S rRNA基因测序技术(DNA水平)对浓香型白酒酒醅细菌群落进行研究发现，发酵25 d时，微生物Shannon指数表现为中层最高，上层最低，与本研究结果正好相反，这可能是由于各研究所使用的测序技术不同，方法的局限性和测序的步骤也不同，给研究结果带来了不同的影响[17]。

分别对各层酒醅样品中的细菌群落和真菌群落在门水平和纲水平上的组成进行进一步解析，结果如图1和图2所示。由图1可以看出，各层酒醅均以厚壁菌门(Firmicutes，95.52%)为主要优势细菌门(图1a))，以芽孢杆菌纲(Bacilli，94.64%)为主要优势细菌纲(图1b))，另外，平均相对丰度>1.00%的其他优势细菌门和纲分别只有变形菌门(Proteobacteria)和γ-变形菌纲(Gammaproteobacteria)。本文基于RNA水平的研究结果与之前基于DNA水平解析得到的酒醅优势菌门相比，具有一定的相似性，例如，厚壁菌门和变形菌门在不同地区浓香型白酒酒醅中均被鉴定为优势细菌门[3,5,11]，表明酒醅的共性特征(如高醇、高酸)可能是富集上述菌门的主要因素[5]。不同层次酒醅之间相比，厚壁菌门和芽孢杆菌纲含量在中层酒醅中较高，变形菌门和γ-变形菌纲含量在上层酒醅中较高，但整体来看，各层酒醅的细菌群落的组成基本一致，无显著差异。在真菌群落中也是如此，各层酒醅中的优势微生物基本一致，如：上、中、下层酒醅均以子囊菌门(Ascomycota，65.48%)为主要优势真菌门，其他平均相对丰度>1.00%的优势真菌门有担子菌门(Basidiomycota)、壶菌门(Chytridiomycota)和毛霉菌门(Mucoromycota)(图2a))，另外，上、中、下层酒醅均以酵母纲(Saccharomycetes，40.27%)为主要优势真菌纲，其他平均相对丰度>1.00%的优势真菌纲有伞菌纲(Agaricomycetes)、散囊菌纲(Eurotiomycetes)、粪壳菌纲(Sordariomycetes)、座囊菌纲(Dothideomycetes)、壶菌纲(Chytridiomycetes)、锤舌菌纲(Leotiomycetes)和毛霉菌纲(Mucoromycetes，除下层外)(图2b))。胡晓龙等[5]研究发现，相同发酵时间节点下，各层酒醅中的原核微生物群落的结构不存在显著差异，这与本

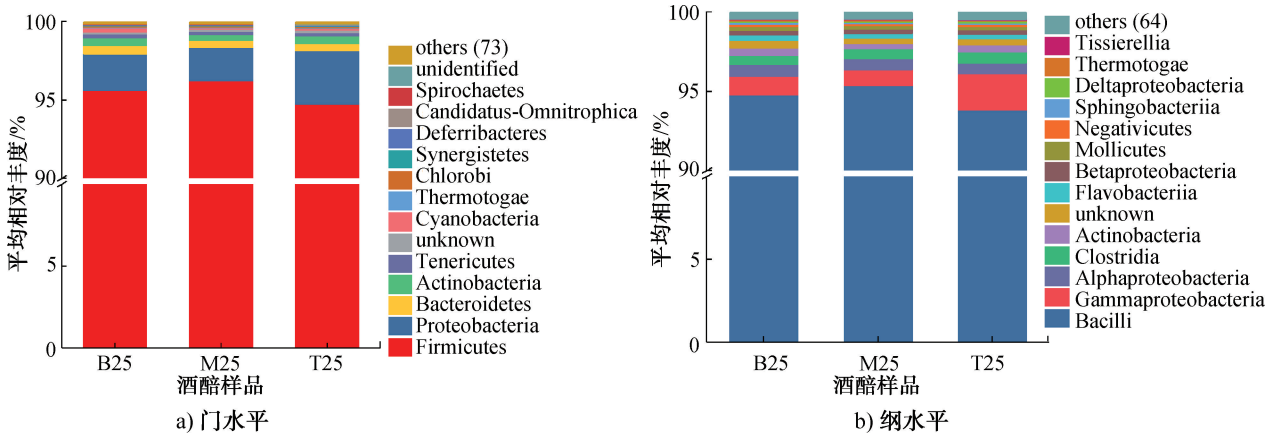

图 1 各层酒醅样品中细菌群落在门水平和纲水平上的组成

Fig. 1 The composition of bacterial communities in each layer of fermented grains samples at phylum level and class level

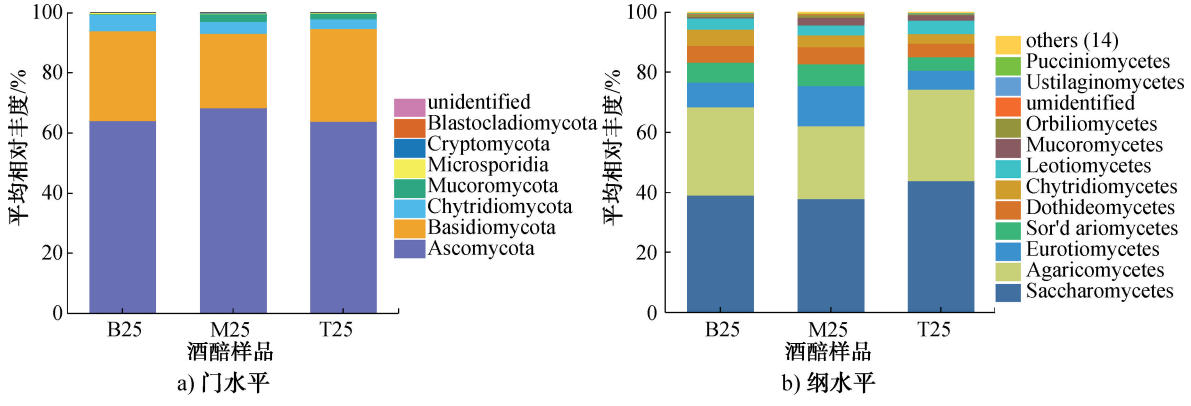

图 2 各层酒醅样品中真菌群落在门水平和纲水平上的组成

Fig. 2 The composition of fungal communities in each layer of fermented grains samples at phylum level and class level

研究结果具有一定的相似性。虽然本研究选取的酒醅在窖池不同层次的物料(大曲、原料、糟醅、辅料等)配比不同,但各层次酒醅的活性微生物群落的组成基本一致,表明物料配比可能不是影响活性微生物菌群在窖池不同空间位置生长和分布的主要因素。

对所有酒醅样品中平均相对丰度排序前 20 名的活性细菌属(94.59%~95.27%)和真菌属(90.59%~93.22%)分别进行热图分析(图 3),通过样品聚类,两者均呈现下层与中层酒醅更为相似的特征。在细菌属中(图 3a)),3 层酒醅均以乳杆菌属(*Lactobacillus*,83.34%)为主要优势细菌属,其他平均相对丰度>1.00%的优势细菌属为片球菌属(*Pediococcus*)和酒球菌属(*Oenococcus*),两者的平均相对丰度在不同层次酒醅中的差别均很小,如片球菌属的平均相对丰度在上层为 3.13%,在中层为 3.24%,在下层为 3.02%。与胡晓龙等[5]研究结果相比,浓香型白酒酒醅发酵后期,以乳杆菌属为主的乳酸菌不仅在 DNA 水平上是优势细菌属,在 RNA 水平上也处于绝对优势。乳酸菌的主要产物乳酸,能增加白酒的厚重感,降低其刺激感,对白酒风味的形成具有重要影响[14]。另外,第一次在浓香型白酒酒醅中发现酒球菌属也为优势菌属,而针对该菌作用的研究在葡萄酒领域较多,其中的一类菌种(*Oenococcus oeni*)可触发葡萄酒中苹果酸-乳酸的发酵,该发酵过程可降低葡萄酒自身的酸度,提高葡萄酒的品质和稳定性[27]。酒球菌属在浓香型白酒发酵过程中可能也起到了一定作用,具体影响有待进一步研究。

在真菌属中,各层酒醅中的优势微生物组成也基本一致,但平均相对丰度略有差异(图 3b))。酵母菌属(*Saccharomyces*)在上层(18.87%)和下层(17.92%)酒醅中均为主要优势真菌属,中层酒醅中则以 *Scheffersomyces*(17.99%)为主要优势真菌属,而 *Scheffersomyces* 在上层(18.86%)和下层(17.45%)酒醅中的平均相对

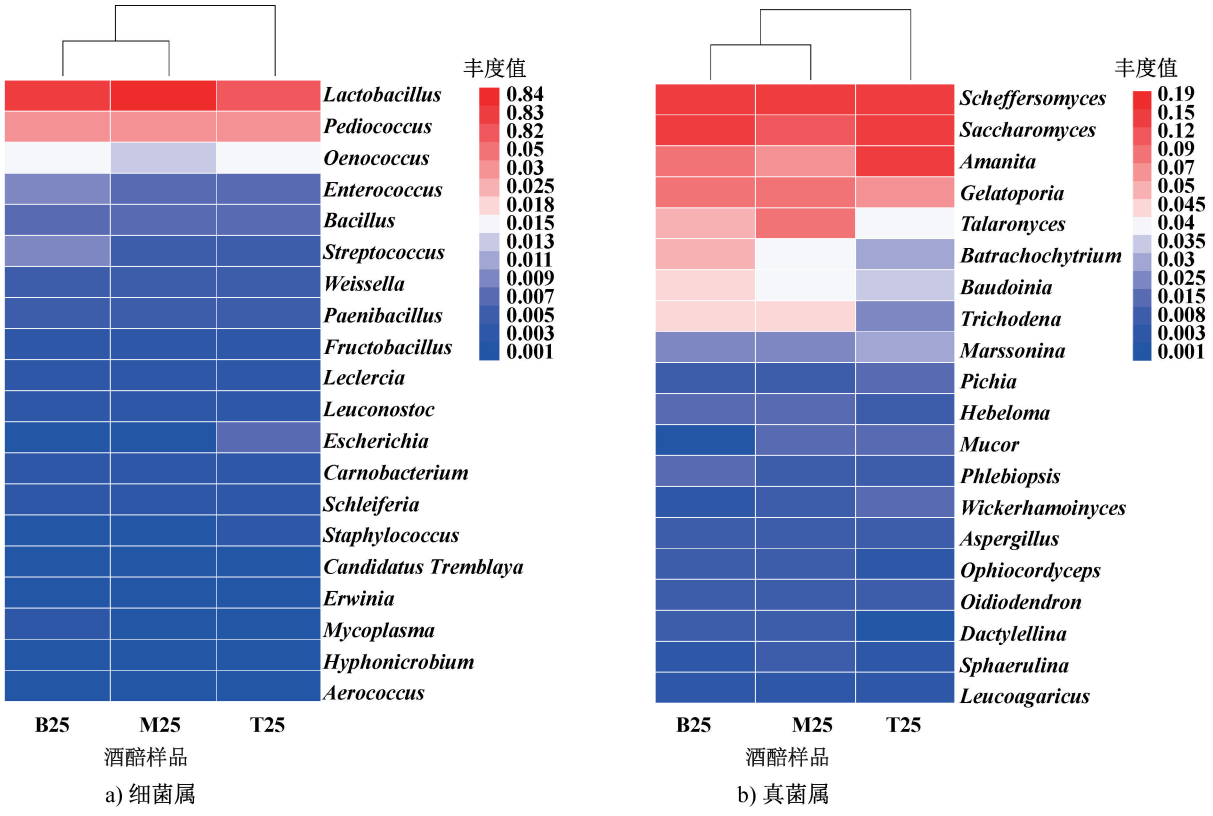

图 3　酒醅样品中平均相对丰度前 20 名的活性细菌属和真菌属的热图

Fig. 3　Heat map of the top 20 active bacterial genera and fungal genera in the average relative abundance of fermented grains samples

丰度只略低于酵母菌属。在 3 层酒醅中共检测到 11 个平均相对丰度>1.00%的其他优势细菌属，包括鹅膏菌属(*Amanita*)、篮状菌属(*Talaromyces*)、盘二孢属(*Marssonina*)、毕赤酵母属(*Pichia*)、滑锈伞属(*Hebeloma*)、曲霉属(*Aspergillus*)、木霉属(*Trichoderma*)、*Gelatoporia*、*Batrachochytrium*、*Baudoinia* 和 *Phlebiopsis*，而在下层和中层酒醅中各细菌属的平均相对丰度更为接近。之前的报道[12-13,15]显示，发酵 25 d 左右时，酒醅中的优势真菌属在 DNA 水平上主要为 *Kazachstania* 和 *Thermoascus*，而本研究酒醅中的优势真菌属在 RNA 水平上主要为酵母菌属或 *Scheffersomyces*，且 *Thermoascus* 的平均相对丰度很低(<0.50%)，*Kazachstania* 未检测到。造成此差异的原因可能包括以下三方面：1)在 DNA 水平上，某些含量较高的酒醅微生物可能处于死亡或休眠状态，其转录活性没有或较低，而一些含量较低的酒醅微生物则可能具有较高的转录活性[1,17]；2)两种水平上，方法的局限性和测序的步骤不同，可能会给结果带来偏差[17,28]；3)白酒酿造地区和酿造工艺存在差异。

2.3　各层酒醅的差异表达基因分析

2.3.1　差异表达基因筛选结果分析　图 4 为不同层次酒醅之间表达丰度具有差异的基因(DEGs)火山图，其中上调基因是指表达量上升的基因，下调基因则与之相反。由图 4 可以看出，酒醅样品 B25 与 M25，B25 与 T25，M25 与 T25 之间的差异表达基因数量分别为 90 个、23 个、67 个，表明中层酒醅分别与下层和上层酒醅之间的差异表达基因数量较多。B25 与 M25 之间(图 4a))，以中层酒醅作为对照组，下调基因数量(49 个)略高于上调基因数量(41 个)，即下层酒醅的基因表达量较中层酒醅低。M25 与 T25 之间(图 4c))，以上层酒醅作为对照组，下调基因数量(59 个)高于上调基因数量(8 个)，即中层酒醅的基因表达量较上层酒醅低。综上可知，上层酒醅的基因表达量较中层和下层酒醅高。

2.3.2　差异表达基因的 KEGG 富集分析　对不同层次酒醅之间的差异上调基因和下调基因分别进行 KEGG 代谢通路富集分析，结果如图 5—7 所示。其

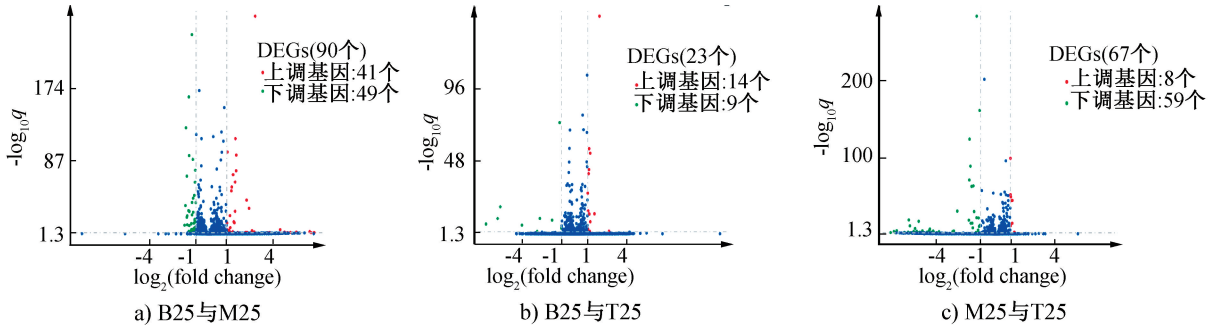

图 4 不同层次酒醅之间表达丰度具有差异的基因(DEGs)火山图

Fig. 4 Volcano map of genes with different expression abundances (DEGs) between different levels of fermented grain

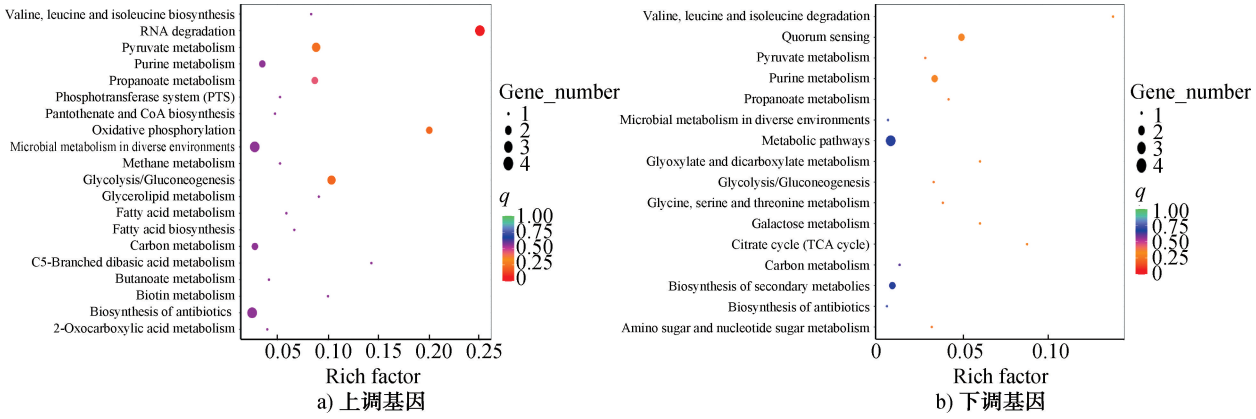

图 5 酒醅样品 B25 与 M25 之间差异上调基因和下调基因的 KEGG 代谢通路富集图

Fig. 5 KEGG pathway enrichment of up-regulated and down-regulated genes between B25 and M25 in fermented grains samples

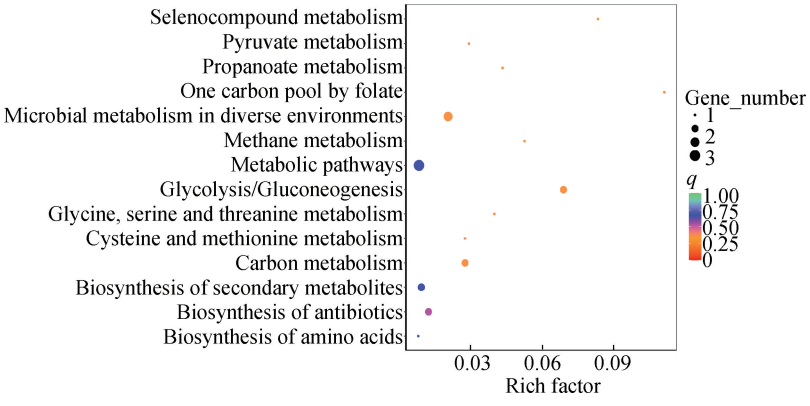

图 6 酒醅样品 B25 与 T25 之间差异上调基因的 KEGG 代谢通路富集图

Fig. 6 KEGG pathway enrichment of the up-regulated genes between B25 and T25 in fermented grains samples

中,Rich factor 指差异表达的基因中位于该代谢通路的基因数目与所有注释基因中位于该代谢通路的基因总数的比值,q 是经多重假设检验校正之后的 p,其取值范围为[0, 1],越接近 0,表示富集越显著;图 5 挑选了富集最显著的 20 条代谢通路进行展示,不足 20 条的则全部展示。相较于中层酒醅样品,下层酒醅样品的上调基因富集到了 25 条代谢通路上(图 5a))。在一级代谢通路上,有 22 条通路属于代谢(Metabolism)、2 条通路属于基因信息加工(Genetic information processing)、1 条通路属于环境信息加工(Environmental information processing),其中富集最显著的通路为 RNA 降解(RNA degrada-

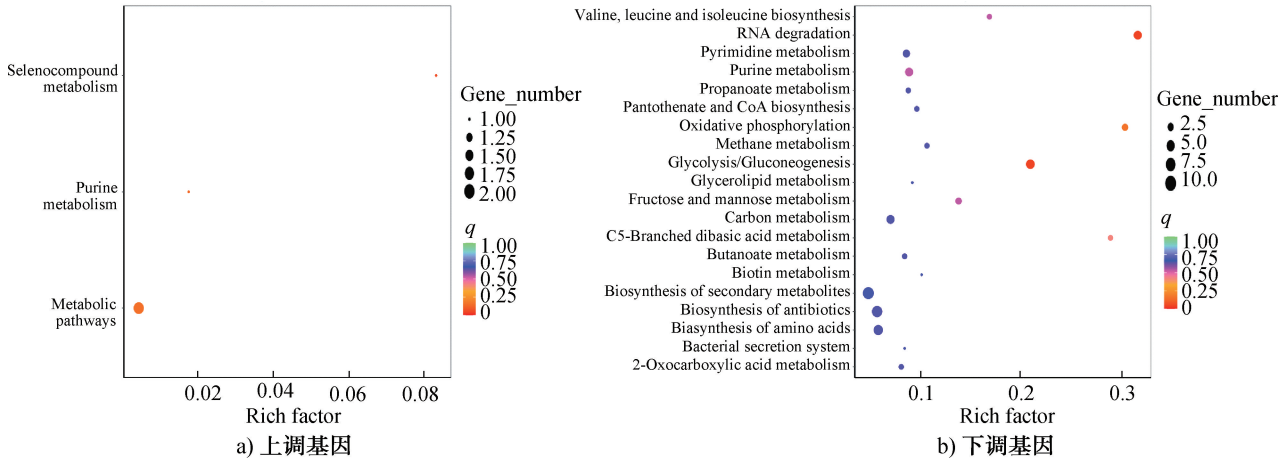

图 7　酒醅样品 M25 与 T25 之间差异上调基因和下调基因的 KEGG 代谢通路富集图

Fig. 7　KEGG pathway enrichment of up-regulated and down-regulated genes between M25 and T25 in fermented grains samples

tion)。RNA 降解在一级代谢通路上属于基因信息加工,下层酒醅中该通路的基因表达量较高,RNA 降解现象较严重,这可能是因为下层酒醅离窖池底部较近,能接触到较多窖泥,且长时间发酵后,底部的黄水水位会上升,而较多的水分和杂质均会导致 RNA 降解。此外,下调基因富集到了 16 条代谢通路上(图 5b)),在一级代谢通路上,有 15 条通路属于代谢、1 条通路属于细胞过程(Cellular processes),其中富集最显著的通路为群体效应(Quorum sensing)。群体效应是一种调节系统,在一级代谢通路上属于细胞过程,可使细菌共享有关细胞密度的信息并相应地调节基因表达[29]。中层酒醅中该通路的基因表达量较高,表明中层酒醅中的活性微生物菌群中的基因表达调节能力强于下层酒醅。

相较于上层酒醅样品,下层酒醅样品的下调基因未富集到任何代谢通路上,上调基因富集到了 14 条代谢通路上(图 6)。在一级代谢通路上,所有通路均属于代谢,其中富集最显著的通路为糖酵解/糖异生(Glycolysis/Gluconeogensis)。糖酵解是将葡萄糖转化为丙酮酸并产生少量 ATP(能量)和 NADH(还原力)的过程,也是产生重要前体代谢产物(葡萄糖-6P、果糖-6P、乙酰-CoA 等)的主要途径[30];糖异生是非碳水化合物前体合成葡萄糖的途径,本质上是糖酵解的逆转[31]。两者在代谢物质生成方面均可发挥重要作用,在发酵 25 d 时,相较于上层酒醅,下层酒醅的活性微生物菌群在代谢活动上贡献更大。

相较于上层酒醅样品,中层酒醅样品的上调基因富集到了 3 条代谢通路上(图 7a))。在一级代谢通路上,均属于代谢,其中富集最显著的通路为硒化合物代谢(Selenocompound metabolism)。此外,下调基因富集到了 34 条代谢通路上(图 7b))。在一级代谢通路上,有 28 条通路属于代谢、3 条通路属于基因信息加工、2 条通路属于环境信息加工、1 条通路属于细胞过程,其中富集最显著的通路为 RNA 降解,其次是糖酵解/糖异生。有研究表明[32],许多微生物可以耐受高质量浓度的 SeO_4^{2-} 和 SeO_3^{2-},有些微生物还可以将低价态的硒氧化为高价态,因此,微生物对硒进行形态转化是有效解决硒引起的环境和健康问题的手段之一。另外,微生物对硒的代谢主要包括硒的转运、还原、氧化、同化、甲基化等。相较于上层酒醅,中层酒醅中硒化合物的代谢水平较高,这可能是因为其中存在一些可影响硒化合物代谢的活性微生物,具体是哪些微生物尚有待进一步研究确认。此外,上层酒醅中的 RNA 降解通路的基因表达较高,且活性微生物菌群在代谢活动上的贡献较大。

综上所述,中层酒醅中的活性微生物菌群对 RNA 降解的影响最低,下层酒醅中的活性微生物菌群在代谢活动上的贡献最大。

3　结论

本研究基于宏转录组学技术分析了位于窖池不

同空间位置的浓香型白酒酒醅(主发酵期结束后的第 25 d)活性微生物群落的组成及差异表达基因。不同酒醅层之间的活性微生物数目差异较小,上层酒醅的细菌物种多样性最高,中层酒醅的真菌物种多样性最高。各层酒醅中的细菌和真菌群落在门、纲和属水平上的物种组成基本一致,均以厚壁菌门和子囊菌门为主要优势细菌门和真菌门,以芽孢杆菌纲和酵母纲为主要优势细菌纲和真菌纲,以乳杆菌属为主要优势细菌属,以酵母菌属(上层和下层)或 *Scheffersomyces*(中层)为主要优势真菌属。在差异表达基因表达水平及功能方面,上层酒醅的基因表达水平较中层和下层酒醅更高,各层之间的差异表达基因功能大部分为代谢,且中层酒醅中的活性微生物菌群对 RNA 降解的影响最低,下层酒醅中的活性微生物菌群在代谢活动上的贡献最大。本研究可丰富人们对浓香型白酒酒醅菌群的认识,为揭示微生物生态系统的特定贡献、开发生物强化等技术以改善浓香型白酒的品质提供参考。

参考文献:

[1] HU X L, WANG K L, CHEN M E, et al. Profiling the composition and metabolic activities of microbial community in fermented grain for the Chinese strong-flavor Baijiu production by using the metatranscriptome, high-throughput 16S rRNA and ITS gene sequencings[J]. Food Research International, 2020, 138: 109765.

[2] HU X L, DU H, REN C, et al. Illuminating anaerobic microbial community and cooccurrence patterns across a quality gradient in Chinese liquor fermentation pit muds[J]. Applied Environmental Microbiology, 2016, 82(8): 2506-2520.

[3] WANG X S, DU H, XU Y. Source tracking of prokaryotic communities in fermented grain of Chinese strong-flavor liquor [J]. International Journal of Food Microbiology, 2017, 244: 27-35.

[4] LIU J, WU Q, WANG P, et al. Synergistic effect in core microbiota associated with sulfur metabolism in spontaneous Chinese liquor fermentation [J]. Applied Environmental Microbiology, 2017, 83(24): 1475-1491.

[5] 胡晓龙,王康丽,余苗,等. 浓香型酒醅微生物菌群演替规律及其空间异质性[J]. 食品与发酵工业,2020,46(10):66-71.

[6] LI X R, MA E B, YAN L Z, et al. Bacterial and fungal diversity in the traditional Chinese liquor fermentation process [J]. International Journal of Food Microbiology, 2011, 146(1): 31-37.

[7] SONG Z W, DU H, ZHANG Y, et al. Unraveling core functional microbiota in traditional solid-state fermentation by high-throughput amplicons and metatranscriptomics sequencing [J]. Frontiers in Microbiology, 2017, 8: 1294.

[8] 刘念,刘绪,张磊,等. 浓香型白酒糟醅中真菌菌群的研究[J]. 食品与发酵科技, 2011, 47(2): 28-31.

[9] 黄治国,罗惠波,侯海波,等. 浓香型白酒酒醅细菌群落结构及其变化规律[J]. 中国酿造, 2012, 31(3): 100-104.

[10] ZHANG W X, QIAO Z W, TANG Y Q, et al. Analysis of the fungal community in Zaopei during the production of Chinese Luzhou-flavour liquor [J]. Journal of the Institute of Brewing, 2012, 113(1): 21-27.

[11] 肖辰,陆震鸣,张晓娟,等. 泸型酒酒醅细菌群落的发酵演替规律[J]. 微生物学报, 2019, 59(1): 195-204.

[12] 肖辰,陆震鸣,张晓娟,等. 泸型酒中层酒醅真菌群落的发酵演替规律[J]. 应用与环境生物学报,2018,24(5):1081-1086.

[13] 刘凡,周新虎,陈翔,等. 洋河浓香型白酒发酵过程酒醅微生物群落结构解析及其与有机酸合成的相关性[J]. 微生物学报, 2018, 58(12): 2087-2099.

[14] 翟磊,于学健,冯慧军,等. 宜宾产区浓香型白酒酿造生境中细菌的群落结构[J]. 食品与发酵工业,2020,46(2):18-24.

[15] ZHANG Y Y, ZHU X Y, LI X Z, et al. The process-related dynamics of microbial community during a simulated fermentation of Chinese strong-flavored liquor[J]. BMC Microbiology, 2017,17(1):196.

[16] BALDRIAN P, KOLAÍK M, TURSOVÁ M, et al. Active and total microbial communities in forest soil are largely different and highly stratified during decomposition[J]. The ISME Journal,2012,6:248-258.

[17] DUAN S, HU X X, LI M R, et al. Composition and metabolic activities of the bacterial community in shrimp sauce at the flavor-forming stage of fermentation as revealed by metatranscriptome and 16S rRNA gene sequencings[J]. Journal of Agricultural Food Chemistry, 2016, 64(12): 2591-2603.

[18] 韩丽丽,吴娟,马燕天,等. 环境微生物转录组学研究进展[J]. 基因组学与应用生物学,2017,36(12):5210-5216.

[19] 雷忠华,陈聪聪,陈谷. 基于宏基因组和宏转录组的发酵食品微生物研究进展[J]. 食品科学,2018,39(3):330-337.

[20] 赵东,乔宗伟,彭志云. 浓香型白酒发酵过程中酒醅微生物区系及其生态因子演变研究[J]. 酿酒科技,2007(7): 37-39.

[21] 张大凤,李可,刘森,等. 中国浓香型白酒窖池糟醅中微生物群落演替分析[J]. 食品科学,2012,33(15):183-187.

[22] 吕辉,张宿义,冯治平,等. 浓香型白酒发酵过程中微生物消长与香味物质变化研究[J]. 食品与发酵科技,2010,46(3):37-40,59.

[23] 王雪山,杜海,徐岩. 清香型白酒发酵过程中微生物种群空间分布[J]. 食品与发酵工业,2018,44(9):1-8.

[24] 王鹏,蒋超,常强,等. 绵甜型白酒酿造过程中酒醅理化指标的变化规律[J]. 酿酒科技,2019(3):59-64.

[25] 杨静,宰红玉,万春环,等. 浓香型白酒窖池内酒醅成分动态分析研究[J]. 酿酒,2018,45(1):55-59.

[26] 胡晓龙,王康丽,宋丽丽,等. 浓香型白酒酒醅中总 RNA 提取方法评价[J]. 食品科学,2021,42(2):74-82.

[27] DEWEY C N, LI B. RSEM: accurate transcript quantification from RNA-Seq data with or without a reference genome[J]. BMC Bioinformatics, 2011,12(1):323.

[28] 王陶,李华,王华,等. 酒酒球菌(*Oenococcus oeni*)相关生物组学研究进展[J]. 食品科学,2014,35(7):305-310.

[29] TOMÁŠ V, PETR B. The variability of the 16S rRNA gene in bacterial genomes and its consequences for bacterial community analyses[J]. PLoS ONE,2013,8(2):e57923.

[30] PAI A, YOU L. Optimal tuning of bacterial sensing potential[J]. Molecular Systems Biology, 2014,5:286.

[31] WATERHOUSE A L, SACKS G L, JEFFERY D W. Glycolysis[M]. New Jersey: Wihey,2016.

[32] KHALIFA F. Regulation of gluconeogenesis and pentose phosphate pathway by intracellular and external metabolic regulators: A review[J]. European Journal of Biochemistry, 2015, 2(5): 206-213.

[33] 徐巧林,吴文良,赵桂慎,等. 微生物硒代谢机制研究进展[J]. 微生物学通报,2017,44(1):207-216.

Study on spatial heterogeneity of active microbial community in strong-flavor Baijiu fermented grains based on metatranscriptome

TIAN Ruijie[1], ZHANG Yong[1], FENG Dahong[1], WANG Kangli[1], CHI Lei[1],
SHEN Xiangkun[2], HU Xiaolong[1], HE Peixin[1]

1. *College of Food and Bioengineering, Zhengzhou University of Light Industry, Zhengzhou* 450001, *China*;
2. *He'nan Food Industry Science Research Institute Co., Ltd., Zhengzhou* 450053, *China*

Abstract: In this study, the metatranscriptome technology was used to study the differences in the composition and genes functions of the physiologically active bacterial and fungal communities in the strong-flavor Baijiu fermented grains (FGs) at different spatial locations of pit. The results showed that 87 phyla, 78 classes, 165 orders, 396 families, 1612 genera and 7234 species were detected in the bacterial community, and 8 phyla, 26 classes, 58 orders, 127 families, 223 genera and 394 species were detected in the fungal community. However, there was little difference in the number of active microorganisms among the top, middle and bottom layers of FGs. There was no significant difference in the bacterial and fungal community composition in each layer of FGs, with Firmicutes and Ascomycota as the main dominant bacterial and fungal phylum, respectively. Bacillus and Saccharomyces were the main dominant bacterial and fungal class, respectively. *Lactobacillus* was the main dominant bacterial genera, *Saccharomyces* (top and bottom) or *Scheffersomyces* (middle) was the main dominant fungal genera. Furthermore, the number of differentially-expressed genes between the bottom and middle layer, and between the middle and upper layer of FGs was higher and it was 90 and 67 respectively. And the differentially-expressed genes were mainly concentrated in RNA degradation and Glycolysis/Gluconeogenesis pathway, and most of the difference gene function between each layer was metabolism. The active microbial flora in the middle FGs had the lowest effect on RNA degradation, and the active microbial flora in the bottom FGs contributed the most to the metabolic activity.

Key words: strong-flavor Baijiu fermented grains; metatranscriptome; active microbial community; spatial heterogeneity

(责任编辑:杨晓娟)

本刊数字网络传播声明

本刊已许可中国知网,万方数据资源系统,维普网,国家科技学术期刊开放平台,博看网,超星,中国科技论文在线,中教数据库,EBSCO*host*,Ulrichs,FSTA 等在其系列数据库产品中以数字化方式复制、汇编、发行、信息网络传播本刊全文。其相关著作权使用费与本刊稿酬一并支付。作者向本刊提交文章发表的行为即视为同意我刊上述声明。