

自然发酵的岭南桑葚果酒的细菌多样性分析

黄娟^{1,2}, 黄燕燕¹, 冯立科², 余保宁², 彭小霞², 申益¹

(¹华南理工大学食品科学与工程学院 广州 510640

²广东燕塘乳业股份有限公司 广州 511356)

摘要 目的:基于高通量测序分析不同自然发酵周期的岭南桑葚果酒的细菌分布特征。方法:采集广州永和镇创鲜果桑采摘园的 6 个月短时发酵桑葚新酒(STF)和 18 个月长时发酵桑葚陈酒(LTF),提取其发酵全液总的生物 DNA,进行 16S rRNA 细菌保守区域扩增、纯化和测序。下机后通过专业的生物学分析软件对测序数据进一步加工,包括物种注释、聚类分析、潜在生物功能预测分析、多样性分析等。结果:高通量测序获得新酒和陈酒的平均细菌 Tag 数目分别为 126 126 个和 127 401 个,平均 OTUs 数目分别为 746 个和 789 个,经物种注释,主要为变形菌门、拟杆菌门、厚壁菌门、蓝细菌门、放线菌门、Epsilonbacteraeota、酸杆菌门、浮霉菌门、芽单胞菌门和绿弯菌门 10 个菌门,以拟杆菌门分枝杆菌属、变形菌门雷拉内拉菌属、变形菌门弯曲菌属、厚壁菌门链球菌属、变形菌门不动杆菌属、变形菌门慢生根瘤菌、变形菌门拉尔斯顿尼亚菌属、变形菌门帕拉伯克霍尔德菌属、拟杆菌门拟杆菌属和放线菌门的分枝杆菌属为主,其中新酒中的拟杆菌门分枝杆菌属显著高于陈酒($P<0.05$),变形菌门不动杆菌属显著低于陈酒($P<0.05$)。结论:不同发酵周期的桑葚果酒细菌具有不同丰富度的微生物群落多样性和差异化的菌群组成结构,功能预测分析显示 LTF 样本菌群中与免疫疾病、心血管疾病、发育、信号分子及相互作用等相关基因功能序列增加,提示桑葚果酒发酵时间过长,增加了产品的食用安全风险。

关键词 桑葚果酒;高通量测序;细菌多样性

文章编号 1009-7848(2023)03-0329-10 DOI: 10.16429/j.1009-7848.2023.03.034

桑葚自古以来就被认为是保健圣品,桑葚果酒酒精度一般只有 5~14 度,酒精含量低于啤酒等酒类,含有丰富的花色苷等天然色素,属于富色食品,同时含有丰富的各种维生素和 17 种必需氨基酸,比其它果酒更有效地调节脏腑代谢,舒缓情绪,增强人体免疫力,清除体内有害自由基,改善基础代谢等^[1-3]。经微生物发酵制成的桑葚果酒,含有活性微生物代谢转化生成的多糖、蛋白肽、氨基酸、维生素等有益成分^[4-7]。桑葚果酒的工业化生产开发具有重要的商业价值和前景。

现阶段,微生物群落动态变化规律一般通过 Illumina MiSeq 高通量测序手段来监测^[8-9]。该技术可以表征细菌群落分布、进化情况,预测菌落主导的功能活性与环境间的互作关系,显著拓展了复杂体系的动态发酵过程中微生物学的研究范畴^[1-3]。例如,刘晓柱等^[8]借助高通量测序技术对自然发酵的刺梨汁的细菌群落变化进行监测;谢丹等^[9]基于

同样的技术对发酵的刺梨果渣的细菌多样性进行分析;邱鹏月等^[10]使用该分析技术对桑葚酵素的微生物组成及多样性进行测序,结果显示,在发酵前期,酵母是桑葚酵素中的优势菌,占比 92.16%,细菌中乳杆菌属所占比例最大,趋势为先升高后降低,该研究揭示了自然发酵的桑葚酵素的动态微生物变化规律及其多样性机制,为实现人工可控的新型发酵模式下的桑葚酵素的开发提供重要的理论基础。同样地,利用宏基因组学研究自然发酵桑葚果酒的细菌多样性及变化规律,对于新型适宜发酵生产的野生菌株的开发具有重要的意义,可为实现高附加值工业化的桑葚果酒提供技术参考。本研究以发酵周期差异显著的 2 个自然发酵的岭南桑葚果酒为样本,利用宏基因组学科学技术分析 2 个样品中细菌多样性,筛选高效微生物菌剂,实现果酒发酵技术的革新,为提高桑葚果酒生产效率与质量安全水平提供科学依据^[10-12]。

收稿日期:2022-03-21

基金项目:广州市对外科技合作计划项目(201907010029)

第一作者:黄娟,女,博士

E-mail: 1185537582@qq.com

1 材料与方法

1.1 材料与设备

原料:桑葚果酒:购自岭南永和镇创鲜果桑采

摘园。桑葚果和冰糖按质量比 7:3 不加水放入灭菌的发酵玻璃罐中,置于暗处,于当地自然环境中室温发酵 6~18 个月制得。

试剂:试剂盒(型号 D3142),广州美基生物科技有限公司;相关 PCR 试剂,美国新英格兰生物实验室股份有限公司;无水乙醇,广州化学试剂厂;PCR 引物,广州基迪奥生物有限公司合成。

主要设备:4 ℃ 离心机(型号 Eppendorf 5427R),德国艾本德股份公司;超纯水仪器(型号明澈 TM-D),瑞菲乐生物科技有限公司,-80 ℃ 冰箱(型号 DWHL528S),中科美菱;涡旋振荡器(型号米欧 mix-28+),广州围古润仪器有限公司。

1.2 方法

1.2.1 桑葚果酒样品采集及分组 采用无菌洁具,在 6 个独立发酵的玻璃罐体中采集各 40 mL 酒样,置无菌离心管中。新酒(STF)和陈酒(LTF)各 3 个平行样。自然发酵 6 个月的新酒分别标记为 STF-1、STF-2、STF-3,自然发酵 18 个月的陈酒分别标记为 LTF-1、LTF-2、LTF-3。

1.2.2 桑葚果酒细菌 DNA 的提取 按照试剂盒操作指南操作,所用试剂盒为中国 Magen 的 HiPure 土壤 DNA 提取试剂盒。

1.2.3 PCR 扩增 选定 V3~V4 作为 16S rRNA 基因的目标区域进行引物设计,上游引物为 341F: CCTACGGGNGGCWGCAG; 下游引物为 806R: GGACTACHVGGGTATCTAATPCR。扩增条件:95 ℃ 5 min, 然后,95 ℃ 1 min, 60 ℃ 1 min, 72 ℃ 持续 1 min 的 30 个循环,末段 72 ℃ 保温 7min。PCR 反应一式 3 份。扩增体系:50 μ L 混合物,包含 10 μ L 5 \times Q5[®]反应缓冲液,10 μ L 5 \times Q5[®]高 GC 含量增强剂,1.5 μ L 2.5 mmol/L dNTPs,1.5 μ L 10 μ mol/L 上、下游引物,0.2 μ L Q5[®]高保真 DNA 聚合酶,50 ng 模板 DNA。

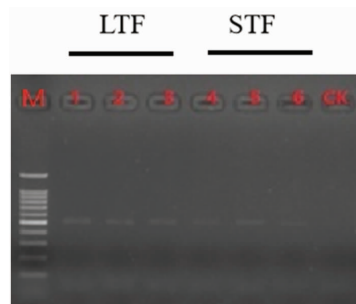
1.2.4 Illumina 测序 PCR 产物上样于 2% 琼脂糖凝胶块样品孔中进行电泳,切胶收集并回收纯化扩增样品。按照 Axygen Biosciences DNA 提取试剂盒说明书对扩增样品进行纯化,样品 DNA 浓度通过 ABI StepOnePlus 实时荧光定量 PCR 系统测定。按照 Illumina 平台的标准程序,对纯化后的扩增子进行 PE250 双端测序,由广州基迪奥生物科技股份有限公司完成相应的建库和 Miseq 测序^[1-3]。

1.2.5 生物信息分析 Miseq 测序数据下机后,选择 Usearch 方法,测序数据的样本为 6 个月自然发酵时长的样本(STF)和 18 个月的样本(LTF),共 2 组,每组 3 个平行重复。由广州基迪奥生物有限公司使用 Omicsmart 动态实时交互在线数据分析平台及 FASTP(版本 0.18.0) Krona(版本 2.6)等专业分析软件对数据质控处理,并聚类、去嵌合体,获得操作分类单元(OTU)代表序列和丰度信息。基于 OTU 序列进行物种注释,各层级的物种丰度信息基于 OTU 丰度信息统计获得,进一步分析获得物种组成、指示物种、 α 多样性、 β 多样性、功能预测、环境因子关联等生物信息。

2 结果与分析

2.1 凝胶电泳鉴定结果

由图 1 所示桑葚果酒样品细菌 16S rDNA PCR 扩增产物凝胶电泳结果可知,LTF 和 STF 共 6 个桑葚果酒样本的 PCR 产物条带显示较好的特异性和亮度,符合测序要求。



注:M. 100 bp Marker,上样量 5 μ L;1~3. 分别为发酵 18 个月(LTF)3 个平行样本;4~6. 分别为发酵 6 个月(STF)3 个平行样本;CK. 以水为模板作为负对照,上样量均为 2 μ L。

图 1 桑葚自然发酵液样品细菌 16S rDNA 扩增产物凝胶电泳图

Fig.1 Gel electrophoresis of 16S rDNA amplification product of nature fermentation liquid samples of mulberry

2.2 测序样本数据分析

分析自然发酵不同周期的桑葚果酒 2 组样本的测序数据,读数共 789 014 条,经过滤、去噪、去嵌合体系列质量控制,得到有效序列共 760 581 条,对应序列的有效率均在 96%以上,序列长度大

表 1 桑葚自然发酵液样品测序样本读数结果

Table 1 Results of sequencing sample reads of nature fermentation liquid samples of mulberry

样品编号	输入序列	过滤后序列	去噪后序列	非嵌合体有效序列	序列有效率/%
LTF-1	135 385	135 041	131 091	130 671	96.52
LTF-2	124 591	124 281	120 468	120 004	96.32
LTF-3	136 355	136 002	131 918	131 528	96.46
STF-1	131 790	131 408	127 122	126 662	96.11
STF-2	131 713	131 335	127 073	126 726	96.21
STF-3	129 180	128 849	125 311	124 990	96.76

部分分布在 204~474 bp, 序列的平均碱基长度约 461 bp, 细菌的 OTUs 平均数目为 767 个 (见表 1)。

2.3 物种注释

在 2.2 节获取的 OTU 丰度信息基础上, 通过基迪奥生物公司专业软件系统统计样品 7 个分类水平序列数目占比, 所述 7 个分类水平为域、门、纲、目、科、属、种, 用于评估样本物种注释的分辨率。相应的 OTU 注释结果见图 2。其属水平分布情况及相对丰度分别见图 3 的 Venn 图和图 4。

由图 2 可知, 属水平上的序列数占比在 60% 以上, 在各分类水平中显示出最高分辨率。

由图 3a 可知, 门水平上, 在自然发酵桑葚果酒中检测到变形菌门 (Proteobacteria)、拟杆菌门 (Bacteroidetes)、厚壁菌门 (Firmicutes)、蓝细菌门 (Cyanobacteria)、放线菌门 (Actinobacteria)、Epsilonbacteraeota、酸杆菌门 (Acidobacteria)、浮霉菌门 (Planctomycetes)、芽单胞菌门 (Gemmatimonadetes) 和绿弯菌门 (Chloroflexi) 10 个菌门的细菌类, 其中变形菌门为优势细菌门, 新酒和陈酒中的平均占比分别为 54.74% 和 47.97%。显著性分析显示差异较显著的是厚壁菌门, 在新酒中检测到的厚壁菌门菌群占比为 9.26%, 而在长时发酵的陈酒样品中厚壁菌门达到 16.09% 的占比, 提示其在桑葚自然发酵 6~18 个月的过程中发挥作用。

由图 3(b) 可知, 纲水平上, 在自然发酵桑葚果酒中检测到优势细菌纲为 γ -变形菌纲 (Gammaproteobacteria)、 α -变形杆菌纲 (Alphaproteobacteria) 和拟杆菌纲 (Bacteroidia), 新酒平均占比分别为 28.24%, 18.78% 和 17.59%, 陈酒平均占比分别为 29.98%, 24.50% 和 25.18%。显著性分析

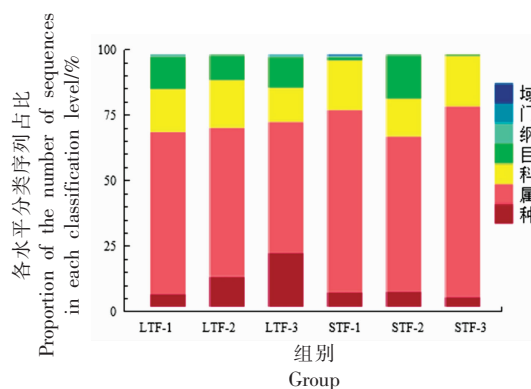


图 2 桑葚自然发酵液样品序列注释程度

Fig.2 Sequence annotation degree of nature fermentation liquid samples of mulberry

显示差异较显著的是氧化光合细菌纲 (Oxyphotobacteria)、杆菌纲 (Bacilli) 和梭状芽孢杆菌纲 (Clostridia), 在新酒检测到的氧化光合细菌纲、杆菌纲和梭状芽孢杆菌纲菌群占比分别为 6.21%, 6.81% 和 2.29%, 而在长时发酵的陈酒样品中的比例分别达到 10.66%, 9.60% 和 6.47%, 提示其在桑葚自然发酵 6~18 个月的过程中发挥作用。

由图 3c 可知, 在目水平上, 自然发酵桑葚果酒中检测到优势细菌目为伯克氏菌目 (Betaproteobacteriales)、噬纤维菌目 (Chitinophagales) 和拉恩氏菌目 (Reyranellales), 新酒平均占比分别为 28.13%, 23.04% 和 14.83%, 陈酒平均占比分别为 18.12%, 12.73% 和 8.75%。在新酒中未检出纤毛虫菌目 (Fimbriimonadales)、亚群_2 (Subgroup_2)、亚群_7 (Subgroup_7)、S085、长微生物菌目 (Longimicrobiales)、软骨杆菌目 (Chthoniobacteriales) 和海洋异养古菌类群 II (Marine_Group_II) 菌目, 而在长时发酵的陈酒样品中检出占比为 0.04%~0.09%, 提示其在桑葚自然发酵 6~18 个月的过程中发挥

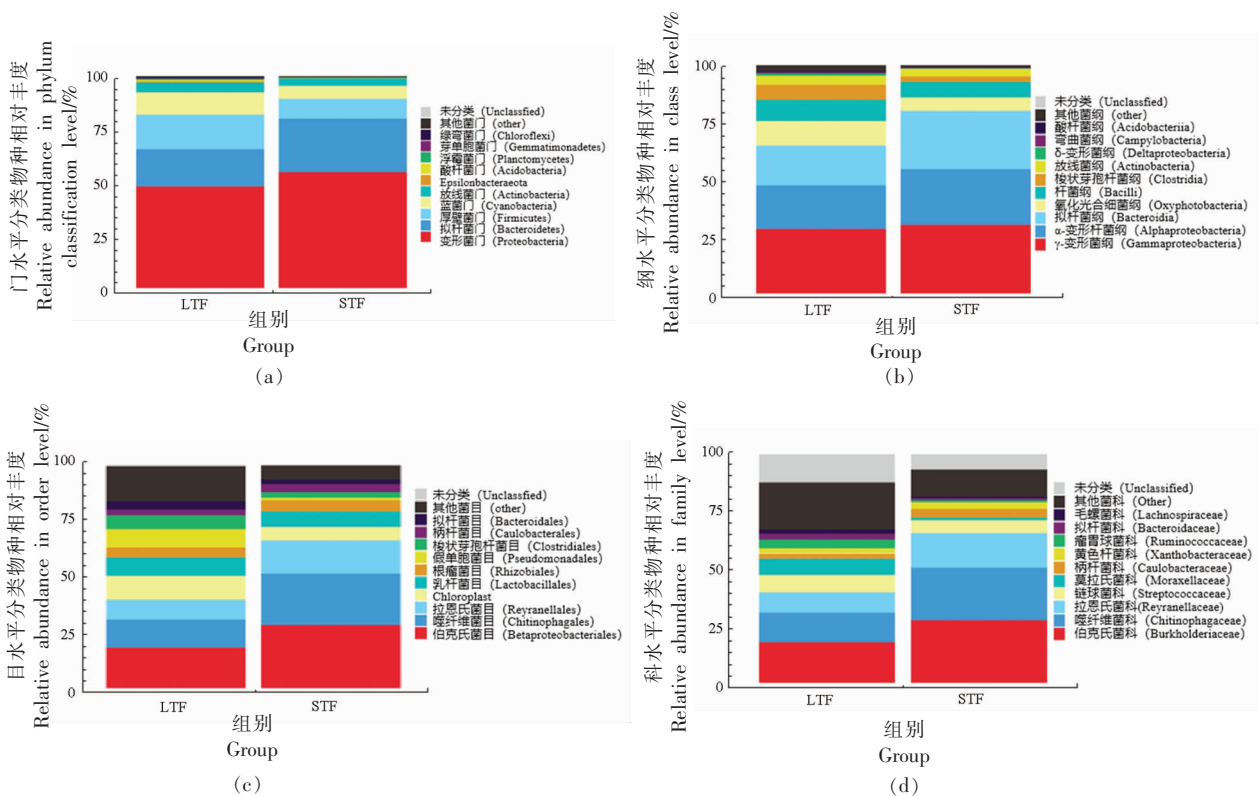
作用。

由图 3d 可知,科水平上,在自然发酵桑葚果酒中检测到优势细菌科为伯克氏菌科(Burkholderiaceae)、噬纤维菌科(Chitinophagaceae)和拉恩氏菌科(Reyraneliaceae),新酒平均占比分别为 27.53%,23.04%和 14.83%,陈酒平均占比分别为 18.05%,12.72%和 8.75%。在新酒中未检出气球菌科(Aerococcaceae)、疣微菌科(Verrucomicrobiaceae)、消化链球菌科(Peptococcaceae)、Longimicrobiaceae、噬纤维菌科、CPla-3_termite_group、67-14 和 mle1-27,而其在长时发酵的陈酒样品中检出占比为 0.04%~0.06%,提示其在桑葚自然发酵 6~18 个月的过程中发挥作用。

由图 3e 和 3f 可知,属水平上,在自然发酵桑葚果酒中检测到优势细菌属为分枝杆菌属(*Sediminibacterium*)、雷拉内拉菌属(*Reyranelia*)、弯曲菌属(*Curvibacter*)和链球菌属(*Streptococcus*),新酒平均占比分别为 22.99%,14.83%,10.46%和 5.83%,陈酒平均占比分别为 12.52%,8.75%,6.11%和 7.62%。在新酒中未检出奈瑟氏球菌属(*Niastella*)、肠杆菌属(*Endobacter*)、气球菌属(*Ae-*

rococcus)、*Ohtaekwangia*、罗氏菌属(*Roseimicrobium*)、*Segetibacter*、*Candidatus_Udaeobacter*、交替红色杆菌属(*Altererythrobacter*)和肠共生杆菌属(*Commensalibacter*),而其在长时发酵的陈酒样品中检出占比为 0.04%~0.07%,提示其在桑葚自然发酵 6~18 个月的过程中发挥作用。随着桑葚的深度发酵,分枝杆菌属、雷拉内拉菌属、慢生根瘤菌属(*Curvibacter bradyrhizobium*)、罗尔斯通氏菌属(*Ralstonia*)、*Mycobacterium* 含量逐渐降低;而链球菌属、不动杆菌属(*Acinetobacter*)、拟杆菌属(*Bacteroides*)、*Massilia*、链霉菌属(*Streptomyces*)、*Maccilibacteroides*、芽孢杆菌属(*Bacillus*)、*Novosphingobium*、醋杆菌属(*Acetobacter*)和 *Dysgonomonas* 细菌在发酵过程中含量不断增加,表明随着桑葚自然发酵的进行,参与糖代谢相关菌群量逐渐降低,而逐渐增加可能是参与酒精、乳酸及醋酸发酵相关的菌群。

由图 4 可知,STF 特有属 35 种,样品 LTF 特有属 42 种,2 组样本共有属 105 种,提示 6~18 个月的发酵,有利于样本微生物的多样性。



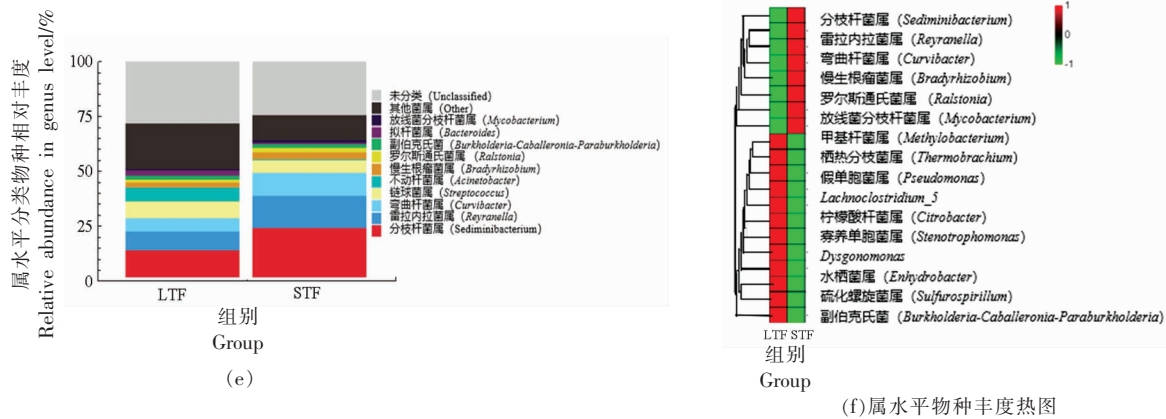


图 3 桑葚自然发酵液样品各分类水平上的细菌菌群相对丰度及门纲属水平上的差异性热图分析

Fig.3 Relative abundance of bacteria community of nature fermentation liquid samples of Mulberry at each level and analysis of the difference by heat map at the phylum and class level

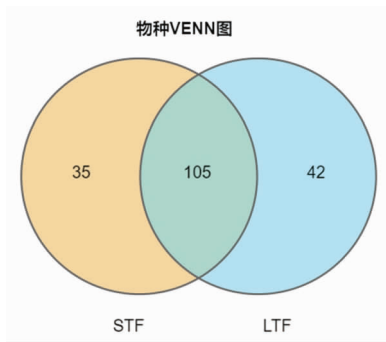


图 4 桑葚自然发酵液的细菌属水平分布韦恩图

Fig.4 Venn diagram of bacteria community distribution at the genus level of nature fermentation liquid samples of mulberry

2.4 Alpha 多样性分析

测序数据量能否充分反映样品中的物种多样性,需要借助稀释曲线来分析,由图 5a 桑葚自然发酵液样品的稀释曲线可知,桑葚自然发酵液 2 组样品细菌 OTU 图表现出较好的平缓性,绝大部分的样本细菌菌群信息被呈现出来。样本物种丰富度也可以由稀释曲线间接反映。2 组样品中, LTF 细菌丰富度程度大于 STF。

样本物种多样性的综合评价通常使用 Shannon 指数,物种多样性越高,对应的数值越大,反之,多样性越低,数值越小。表 2 中, LTF 和 STF 的测序深度覆盖率达到 0.998。LTF 的 Shannon 指数高于 STF, OTU 数也高于 STF 组,说明物种多

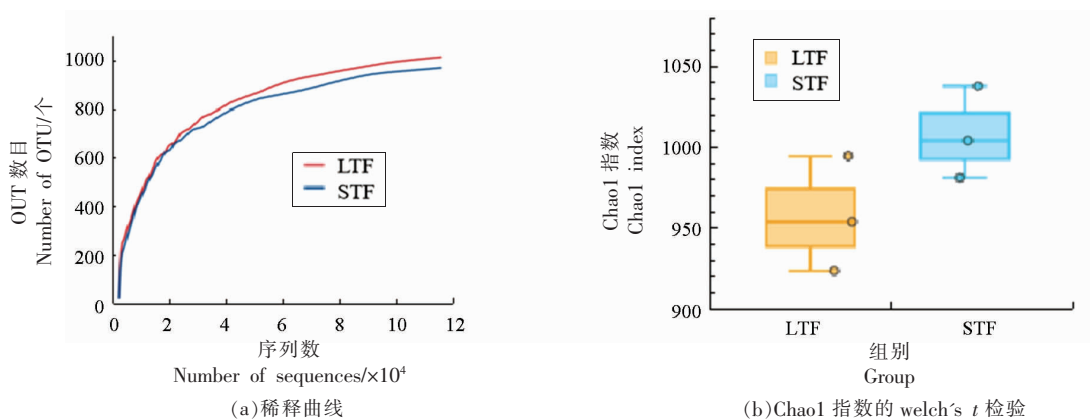


图 5 桑葚自然发酵液样品 α -多样性分析

Fig.5 Diversity analysis of nature fermentation liquid samples of mulberry

样性较为丰富的组别是LTF组。

Ace 指数和 Chao1 指数也可用来衡量样本中物种的种类。样本中物种种类越多,对应的 Ace 指数和 Chao1 指数越大。表 2 中样本 LTF 的 Ace 指

数和 Chao1 指数均高于 STF。图 5b 的 Chao1 指数的 welch's t 检验图显示其指数具有显著性差异 (P<0.05),反映 LTF 的样本种类显著多于 STF。

表 2 桑葚自然发酵液样品 Alpha 多样性指数

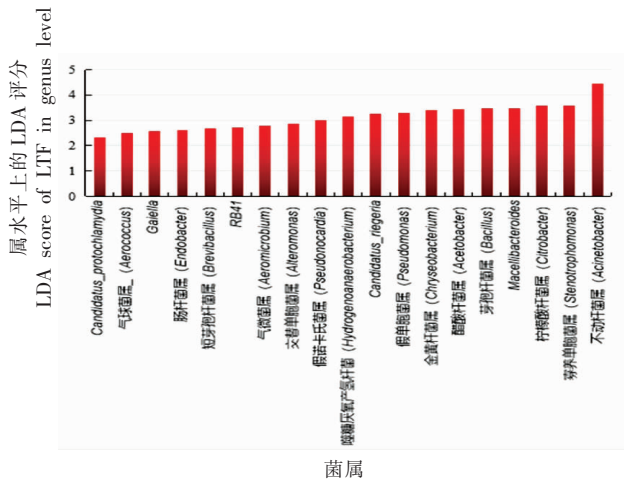
Table 2 Alpha diversity indexes of nature fermentation liquid samples of mulberry

组别	sobs	shannon	simpson	chao	ace	goods_coverage	pielou	pd
LTF	789.33	6.05	0.967	1 011.374	1 043.656	0.998	0.628	79.702
STF	746.33	5.33	0.947	956.867	1 005.395	0.998	0.558	53.313

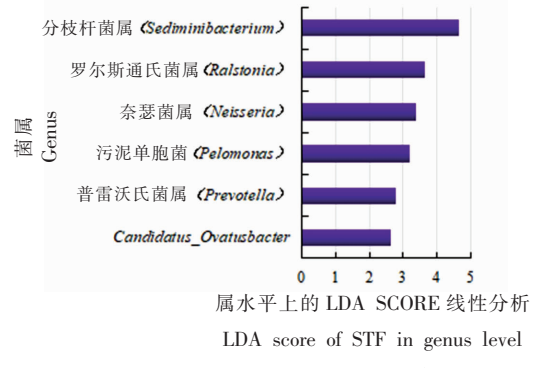
2.5 样本比较分析

LefSe 法是适合菌群丰度差异检验的常见分析方法,是非参数检验和 LDA(线性判别分析)的

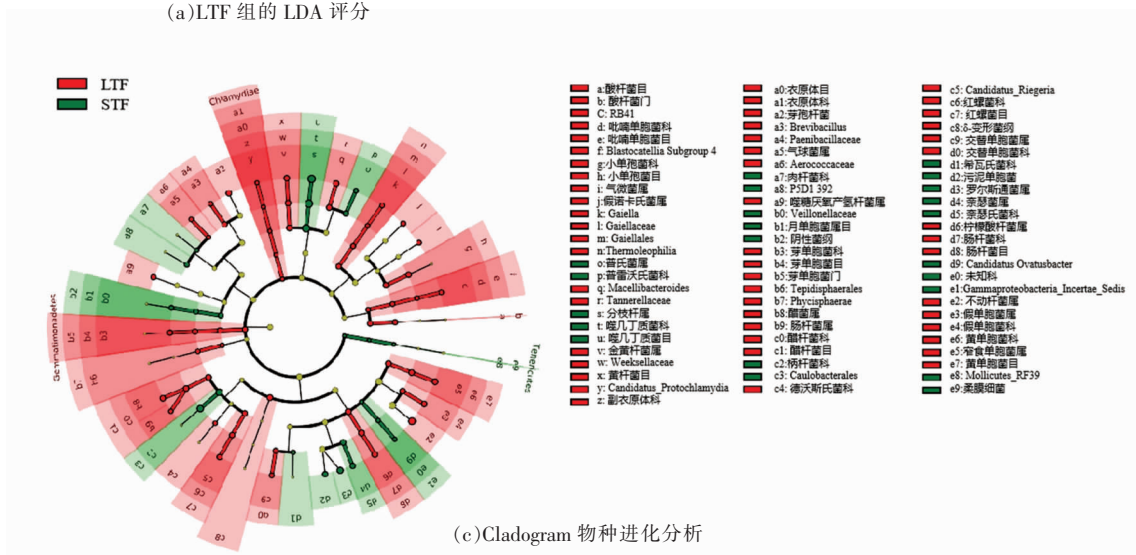
结合。由图 6a、6b 可知,在桑葚自然发酵的样品 LTF 中,菌群总体丰度较高,且 Candidatus_protoclamydia、气球菌属、肠杆菌属、Gaiella、短芽孢



(a)LTF 组的 LDA 评分



(b)STF 组的 LDA 评分



(c)Cladogram 物种进化分析

图 6 桑葚自然发酵液样品细菌菌群属水平上的 LefSe 法线性判别分析

Fig.6 Linear discriminant analysis in genus level of bacteria community of nature fermentation liquid samples of mulberry by LefSe method

杆菌属 (*Brevibacillus*)、*RB41*、气微菌属 (*Aeromicrobium*)、交替单胞菌属、假诺卡氏菌属 (*Pseudonocardia*)、噬糖厌氧产氢杆菌属 (*Hydrogenoanaerobacterium*)、*Candidatus_riegeria*、金黄杆菌属 (*Chryseobacterium*)、醋杆菌属、假单胞菌属 (*Pseudomonas*)、芽孢杆菌属、*Macellibacteroides*、寡养单胞菌属 (*Stenotrophomonas*)、柠檬酸杆菌属 (*Citrobacter*)、不动杆菌属等菌属在样品 LTF 中分布较为特异性,且不动杆菌属菌群丰度较高;在 STF 中,*Candidatus_ovatusbacter*、普雷沃氏菌属 (*Prevotella*)、污泥单胞菌 (*Pelomonas*)、奈瑟氏球菌属、罗尔斯通氏菌属、分枝杆菌属分布较为特异性,且分枝杆菌属菌群丰度较高。

STF 和 LTF 的组内及组间从域水平到属水平的序列间的进化距离及物种丰富差异度如图 6c 所示。LTF 组的 b 酸杆菌纲 (*Acidobacteriia*) 的 a 酸杆菌目 (*acidobacteriales*) 和 STF 组的 e9 柔膜菌纲 (*Mollicutes*) 的 e8 柔膜菌纲_RF39 菌目之间的距离最远,亲缘关系最薄弱。

2.6 功能潜能预测分析

使用 BugBase 软件预测样本菌落的表型功能如图 7a 所示。LTF 样本菌群中含有更多的厌氧菌及革兰氏阳性菌的典型基因序列信息,且显著性分析表明,STF 中包含的移动元素显著高于 LTF 样本,提示超长时间的桑葚酒发酵更倾向于厌氧发酵,STF 倾向于兼性厌氧模式,含有更多的可移动的菌落。

借助 KEGG 功能注释数据库,使用 PICRUSt2 软件预测桑葚自然发酵过程中各菌群的功能特

性,结果见图 7b 和图 8。LTF 样本菌群中与代谢相关的铁载体群非核糖体肽的生物合成 (*Biosynthesis siderophore group nonribosomal peptides*) 与人类疾病 (*Human Diseases*) 相关的细菌入侵上皮细胞 (*Bacterial invasion of epithelial cells*) 过程显著高于 STF 组 ($P < 0.05$); 而 STF 样本中氨基酸代谢、碳水化合物代谢、辅因子和维生素的代谢、异生物质的生物降解和代谢、萜类化合物和聚酮化合物的代谢、其它氨基酸的代谢、脂质代谢、能量代谢、复制和修复、折叠、分类和降解等过程高于 LTF 样本,而免疫疾病、心血管疾病、发育、信号分子及相互作用则低于 LTF 样本,提示 STF 和 LTF 样本含有多肽、多糖等丰富的菌群次生代谢产物对人体有一定的保健功能,而太长时间发酵的 LTF 样本可能受到外界环境的污染或其它影响,同时样本菌群中也可能出现引起免疫疾病和心血管疾病相关的致病菌,有一定的食用安全风险。

2.7 环境因子关联分析

基于距离矩阵的 Mantel test 检验酒精度 (*adc*)、酸度 (*aci*)、pH、5% 样本的 DPPH 清除活性 (*dpsh1*)、1.33% 样本的 DPPH 清除活性 (*dpsh2*)、多糖含量 (*polysaccharide*) 这 6 个环境因子与 LTF 和 STF 整个微生物群落的相关性。Mantel test 的相关性越大, P 值越小,说明环境因子对微生物群落的影响越大。图 9 结果显示所有环境因子与芽单胞菌门水平显著性相关 ($P < 0.01$),多糖含量与装甲菌门 (*Armatimonadetes*) 水平显著性相关 ($P < 0.05$); 多糖含量对菌门的影响程度较高,达 15.23%,其它环境因子影响较低,均为 4.61%。

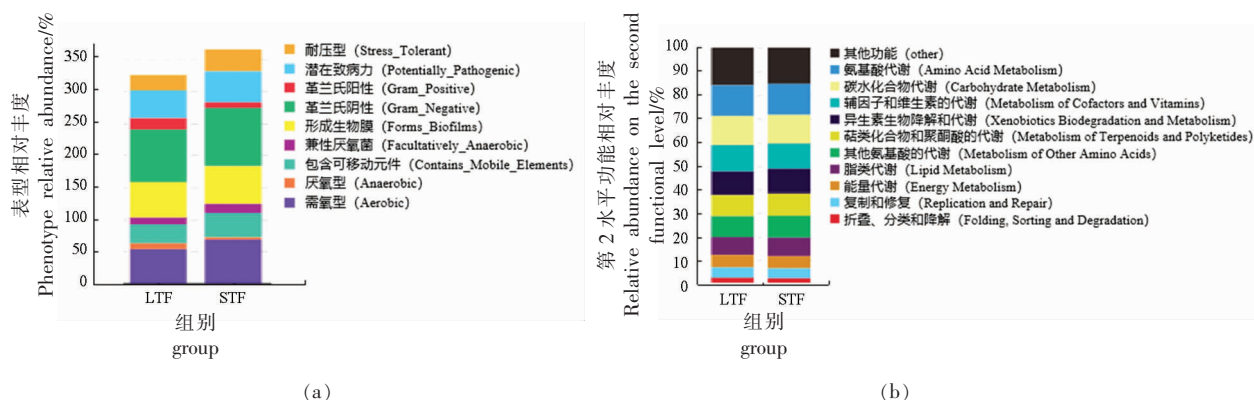


图 7 桑葚自然发酵液样品细菌菌群功能特性分析

Fig.7 Analysis of the bacteria functional characteristics of nature fermentation liquid samples of mulberry

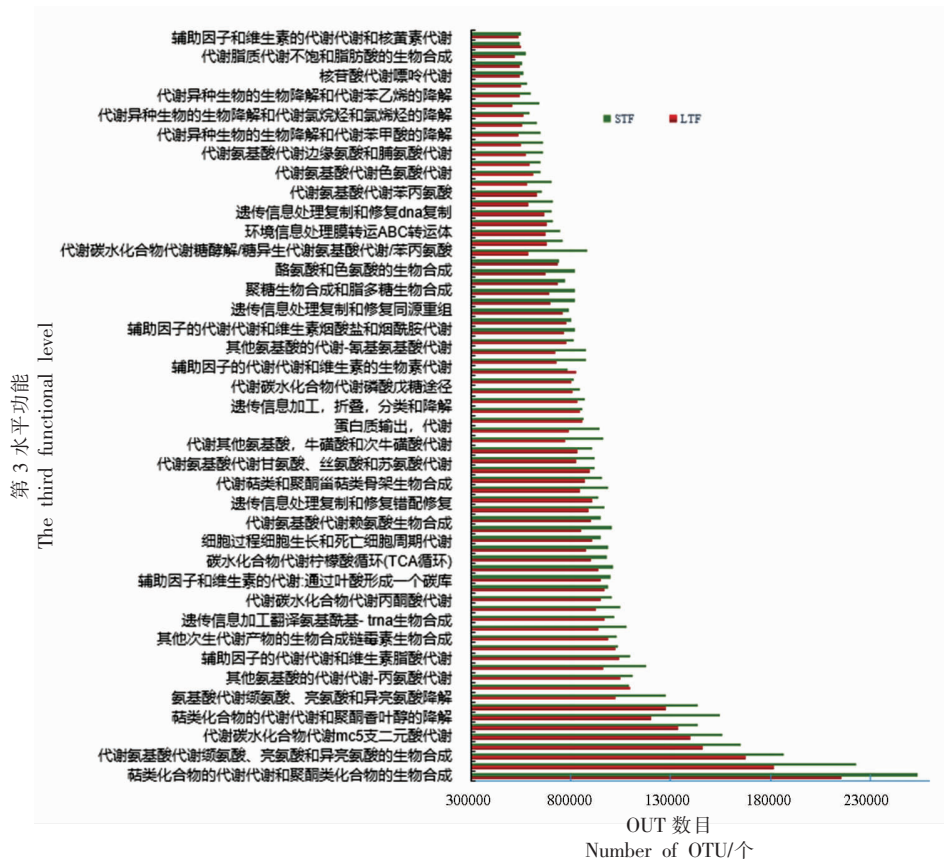
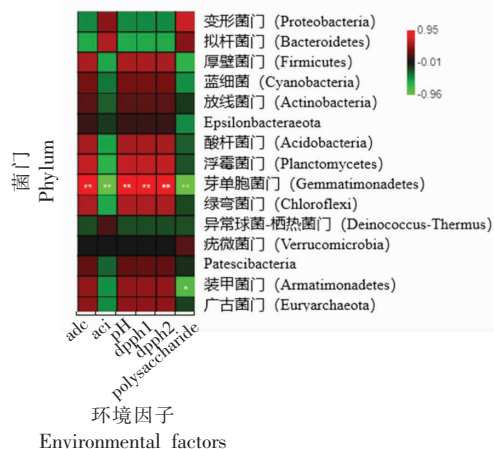


图 8 桑葚自然发酵液样品细菌菌群第 3 水平功能特性预测分析

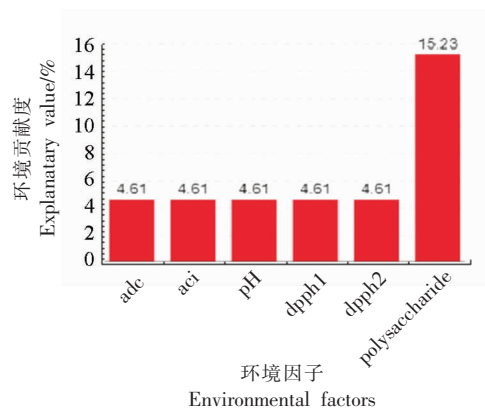
Fig.8 Prediction and analysis of functional characteristics of nature fermentation liquid samples of mulberry in the third level

CCA 分析结果显示：多糖含量指示箭头与坐标轴的夹角较酒精度的小，箭头长度较短，STF 样本点距离多糖含量箭头较近，LTF 样本点距离 adc 箭头较近，所处象限提示多糖含量对菌门水平呈正相关作用，adc 对菌门水平呈负相关作用。箭头长

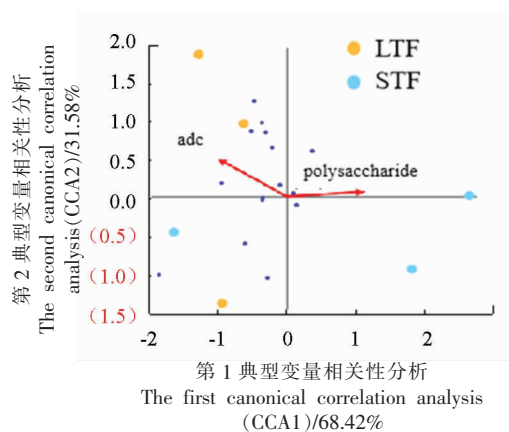
度提示其对样本菌落分布影响比 adc 小，箭头夹角提示其与菌门的相关性比 adc 大，样本点与箭头之间的距离提示 adc 对 LTF 样本影响较大，多糖含量对 STF 样本影响较大。



注：**代表 $P < 0.01$ ，* 代表 $P < 0.05$ 。
(a) 门水平相关性热图



(b) 环境因子贡献度分析图



(c) 典范相关性分析图(CCA)

注:adc、aci、pH、dpph1、dpph2、polysaccharide 分别为酒精度、酸度、样本氢离子浓度指数、5%样本的 DPPH 清除活性、1.33%样本的 DPPH 清除活性、多糖含量。

图9 桑葚自然发酵液样品细菌菌群门水平与环境因子的关联分析

Fig.9 Correlation analysis of bacterial flora by phylum level and environmental factors in mulberry natural fermentation broth samples

3 结论

采用高通量测序方法解析 2 个自然发酵周期的岭南桑葚果酒的细菌多样性,结果表明,6 个月短时自然发酵的新酒,继续发酵为陈酒(18 个月)的过程中,细菌的多样性和丰富度程度增加,厌氧菌和革兰氏阳性菌不断增加。新酒中的拟杆菌门分枝杆菌属显著减少($P < 0.05$),变形菌门不动杆菌属显著增加($P < 0.05$)。本研究掌握了新酒发酵为陈酒的过程中细菌多样性及其菌群结构的变化,为桑葚果酒样本真菌多样性分析、优质菌种资源选育及桑葚果酒工业化生产奠定了基础。

参 考 文 献

- [1] 邸鹏月, 彭宇, 李晨, 等. 基于宏基因组分析桑葚酵素的微生物多样性[J]. 中国食品学报, 2020, 20(5): 251-257.
DI P Y, PENG Y, LI C, et al. Analysis of the microbial diversity of mulberry enzymes based on metagenomics[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2020, 20(5): 251-257.
- [2] 胡永正. 桑葚酒发酵工艺优化及动力学研究[D]. 成都: 西华大学, 2018.
HU Y Z. Research on optimization and kinetics of mulberry wine fermentation process [D]. Chengdu: Xihua University, 2018.
- [3] 韩松林, 赵东升. 桑葚的营养价值和发酵酒生产技术[J]. 食品安全导刊, 2021, 76(3): 135-136.
HAN S L, ZHAO D S. The nutritional value of mulberry and the production technology of fermented wine[J]. Food Safety Guide, 2021, 76(3): 135-136.
- [4] 杨新. 开阳地区桑葚果园富硒酵母菌的筛选及其特性研究[D]. 贵阳: 贵州大学, 2020.
YANG X. Screening and characteristics of selenium-enriched yeast in mulberry orchard in Kaiyang area [D]. Guiyang: Guizhou University, 2020.
- [5] 姚笛, 徐磊, 李佳慧. 三种酵素的抗氧化活性与微生物多样性的相关性研究[J]. 天然产物研究与开发, 2020, 32(6): 928-936.
YAO D, XU L, LI J H. Research on the correlation between the antioxidant activity of three enzymes and microbial diversity [J]. Natural Products Research and Development, 2020, 32(6): 928-936.
- [6] 黄正勇, 梁贵秋, 黎书明, 等. 桑葚果酒酿造质量控制的研究[J]. 广西蚕业, 2013, 50(2): 53-58.
HUANG Z Y, LIANG G Q, LI S M, et al. Research on the quality control of mulberry wine brewing [J]. Guangxi Sericulture, 2013, 50(2): 53-58.
- [7] 庞建光, 朱铮, 武龙. 桑园生草对土壤养分、微生物及桑葚品质的影响[J]. 河北大学学报(自然科学版), 2017, 37(3): 267-273.
PANG J G, ZHU Z, WU L. The effect of grass growing in mulberry field on soil nutrients, microorganisms and mulberry quality [J]. Journal of Hebei

- University (Natural Science Edition), 2017, 37(3): 267–273.
- [8] 刘晓柱, 张远林, 李银凤, 等. 高通量测序技术分析刺梨自然发酵过程中细菌多样性[J]. 中国酿造, 2020, 39(8): 82–85.
- LIU X Z, ZHANG Y L, LI Y F, et al. High-throughput sequencing technology analysis of bacterial diversity in the natural fermentation process of prickly pear[J]. China Brewing, 2020, 39(8): 82–85.
- [9] 谢丹, 刘晓燕, 毕远林, 等. 基于高通量测序分析刺梨果渣自然发酵过程中细菌群落结构及多样性[J]. 食品工业科技, 2019, 40(22): 110–114.
- XIE D, LIU X Y, BI Y L, et al. Based on high-throughput sequencing analysis of bacterial community structure and diversity in the natural fermentation process of prickly pear pomace[J]. Food Industry Science and Technology, 2019, 40(22): 110–114.
- [10] HERMAN R A, WANG J Z, AMUZU P, et al. Evaluation of inhibitory activities of two medicinal plant extracts *Parkia biglobosa* and *Lonicera japonica* against spoilage microorganisms isolated from mulberry fruit[J]. Journal of Food Processing and Preservation, 2020, 44(8): 1–11.
- [11] CHEN Y S, WU H C, YANAGIDA F, et al. Isolation and characteristics of lactic acid bacteria isolated from ripe mulberries in Taiwan[J]. Brazilian Journal of Microbiology, 2010, 41(4): 916–921.
- [12] 曹淑芬, 李文楚. 微生物转化的研究和应用[J]. 广东蚕业, 2012, 46(2): 45–50.
- CAO S F, LI W C. Research and application of microbial transformation [J]. Guangdong Sericulture, 2012, 46(2): 45–50.

Analysis of Bacterial Diversity in Lingnan Characteristic Mulberry Wine of Different Natural Fermentation Cycles

Huang Juan^{1,2}, Huang Yanyan¹, Feng Like², Yu Baoning², Peng Xiaoxia², Shen Yi¹

¹School of Food Science and Engineering, South China University of Technology, Guangzhou 510640

²Office, Guangdong Yantang Dairy Co., Ltd, Guangzhou 511356

Abstract Objective: Through high-throughput sequencing, the bacterial distribution characteristics of Lingnan mulberry fruit wine with different natural fermentation cycles were explored, so as to improve the food safety and quality of fermented fruit wine products. Methods: A 6-month short-term fermented mulberry new wine (STF) and an 18-month long-term fermented mulberry aged wine (LTF) from the Chuangxian Fruit Mulberry Picking Garden in Yonghe Town, Guangzhou, Lingnan Province were collected, and the total biological DNA of the whole fermentation liquid was extracted, and the 16S rRNA bacterial conserved region amplification, purification and sequencing analysis were performed, and the sequencing data were further processed by professional biological analysis software, including species annotation, cluster analysis, potential biological function prediction analysis, diversity analysis, etc. Results: The average number of bacterial tags for new wine and aging wine were 126 126 and 127 401 respectively, and the average number of OTUs were 746 and 789 respectively by high-throughput sequencing. After species annotation, 10 main phyla are Proteobacteria, Bacteroidetes, Firmicutes, Cyanobacteria, Actinobacteria, Epsilonbacteraeota, Acidobacteria, Planctomycetes, Gemmatimonadetes and Chloroflexi. *Sediminibacterium*, *Reyranella*, *Curvibacter*, *Streptococcus*, *Acinetobacter*, *Bradyrhizobium*, *Ralstonia*, *Burkholderia-Caballeronia-Paraburkholderia*, *Bacteroides* and *Actinobacteria* are mainly genus. *Sediminibacterium* in new wine was significantly higher than that of aged wine ($P < 0.05$), and *Acinetobacter* was significantly lower than that of aged wine ($P < 0.05$). Conclusion: Lingnan mulberry fruit wine bacteria with different fermentation cycles have different richness of microbial community diversity and differentiated bacterial community composition. The functional prediction analysis shows that the LTF sample flora is related to immune diseases, cardiovascular diseases, development, signaling molecules and interactions. The increase indicates that the fermentation time of mulberry fruit wine is too long, which increases the food safety risk of the product.

Keywords Mulberry wine; high-throughput sequencing; bacterial diversity