

## 原料预处理对柿子酒发酵过程中微生物群落演替的影响

张艳峰，张晓云

**Effect of Raw Material Pretreatment on Microbial Community Succession during the Fermentation of Persimmon Wine**

ZHANG Yanfeng and ZHANG Xiaoyun

在线阅读 View online: <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2022070165>

## 您可能感兴趣的其他文章

### Articles you may be interested in

#### 基于MiSeq高通量测序技术宣恩地区米酒微生物多样性解析

Analysis of Microbial Diversity of Rice Wine in Xuanen Area Based on MiSeq High-throughput Sequencing Technology

食品工业科技. 2020, 41(21): 128–132, 138 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2019110207>

#### 基于高通量测序技术分析东北豆酱的微生物多样性

Analysis of Microbial Diversity of Northeast Soy Sauce Based on High-throughput Sequencing Technology

食品工业科技. 2020, 41(12): 100–105 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2020.12.016>

#### 贵州腌鱼中微生物群落的多样性研究

Analysis of Microbial Community Diversity in Guizhou Suan Yu

食品工业科技. 2021, 42(5): 119–125 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2020040117>

#### 基于高通量测序技术分析青藏高原牦牛和犏牛乳中微生物多样性的研究

Study on Microbial Diversity in Milk of Yak and Cattle-Yak in Qinghai-Tibet Plateau Based on High-throughput Sequencing Technology

食品工业科技. 2021, 42(9): 122–128 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2020080045>

#### 基于高通量测序的江西特色发酵豆豉中微生物群落多样性及其特征分析

Diversity and Characteristics of Microbial Community in Fermented Douchi from Jiangxi Province Using High-throughput Sequencing Technology

食品工业科技. 2019, 40(3): 85–89, 96 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2019.03.014>

#### 基于16S rDNA高通量测序技术分析北京豆汁儿微生物多样性和功能预测的研究

Analysis of Microbial Diversity and Functional Prediction of Douzhir Based on 16S rDNA High-throughput Sequencing Technology

食品工业科技. 2020, 41(2): 95–100 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2020.02.016>



关注微信公众号，获得更多资讯信息

张艳峰, 张晓云. 原料预处理对柿子酒发酵过程中微生物群落演替的影响 [J]. 食品工业科技, 2023, 44(14): 111–120. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2022070165

ZHANG Yanfeng, ZHANG Xiaoyun. Effect of Raw Material Pretreatment on Microbial Community Succession during the Fermentation of Persimmon Wine[J]. Science and Technology of Food Industry, 2023, 44(14): 111–120. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2022070165

· 生物工程 ·

# 原料预处理对柿子酒发酵过程中微生物群落演替的影响

张艳峰\*, 张晓云

(山西大学生命科学学院, 山西太原 030006)

**摘要:** 为获得不同预处理的柿子在发酵过程中的单宁含量和微生物群落的动态变化以及它们之间的相关性, 本实验在相同条件下分别以柿子果肉 (S)、冻柿子果肉 (D)、柿子皮 (P)、经单宁酶处理的柿子果肉 (M) 酿造柿子酒, 并对其发酵过程中的单宁含量和微生物菌群结构及多样性进行分析, 为后期调控柿子酒中的单宁含量提供理论基础。结果表明: 四种预处理在发酵过程中单宁含量均呈现先增加后逐渐下降的变化趋势, 但经单宁酶处理的柿子果肉 (M) 酿造的柿子酒中的单宁含量与其它预处理相比一直处于最低; 在细菌微生物群落结构的门水平上, 发酵第 1 d 的优势菌门均为蓝藻菌门 (*Cyanobacteria*), 而第 3~9 d 主要的优势菌门为厚壁菌门 (*Firmicutes*) 和变形菌门 (*Proteobacteria*); 在属水平上, 优势菌属差异较大, 分别为片球菌属 (*Pediococcus*) (S)、明串珠菌属 (*Leuconostoc*) (D)、不动杆菌属 (*Acinetobacter*) (P)、葡糖杆菌属 (*Gluconobacter*) 和片球菌属 (*Pediococcus*) (M)。在真菌微生物群落的门水平上, 子囊菌门一直处于绝对优势菌门; 在属水平上, 优势菌属均为复膜酵母菌属 (*Saccharomyces*)。和细菌相比, 不同预处理的柿子酒在发酵过程中的真菌具有更强的相似性。此外, 柿子果肉 (S)、冻柿子果肉 (D)、柿子皮 (P) 和经单宁酶发酵的柿子果肉 (M) 在发酵中的单宁含量与微生物菌属呈显著相关性的分别有 10、5、3、7 种, 且微生物菌属各不相同。初步表明, 原料预处理会影响柿子酒发酵过程中的单宁含量与微生物相关性。

**关键词:** 高通量测序, 柿子酒, 单宁含量, 微生物多样性

中图分类号: TS261.1

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2023)14-0111-10

DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2022070165

本文网刊: 

## Effect of Raw Material Pretreatment on Microbial Community Succession during the Fermentation of Persimmon Wine

ZHANG Yanfeng\*, ZHANG Xiaoyun

(College of Life Sciences, Shanxi University, Taiyuan 030006, China)

**Abstract:** In this study, persimmon wine was brewed with fresh persimmon pulp (S), frozen persimmon pulp (D), persimmon peel (P), and persimmon pulp treated with tannins (M) under the same conditions. Tannin content and the microbial community structure and diversity during fermentation were analyzed separately in order to analyze dynamic changes to the tannin content and microbial community during the fermentation of persimmon wine following pretreatment with different raw materials and to analyze the differences and correlations between the various raw materials in order to provide a theoretical basis for the later regulation of tannin content in persimmon wine. The results showed that, in all four pretreatments, the tannin content showed a trend of increasing and then gradually decreasing during fermentation, but the tannin content in persimmon wine made from persimmon pulp (M) treated with tannase was always at the lowest tannin content of all the pre-treatments. At the level of the bacterial community structure, the dominant phyla was cyanobacteria on the first day of fermentation, while the dominant phyla from the third day to the ninth day were Firmicutes and

收稿日期: 2022-07-14

基金项目: 山西大学杏花村学院(山西酿造产业研究院(筹))开放基金资助(XCSXU-KF-202014)。

\* 通信作者: 张艳峰(1980-), 女, 博士, 副教授, 研究方向: 食品微生物, E-mail: zyf@sxu.edu.cn。

Proteobacteria. At the genus level, the dominant phyla varied, with the most frequent phyla being *Pediococcus* (S), *Leuconostoc* (D), *Acinetobacter* (P), *Gluconobacter* and *Pediococcus* (M), respectively. At the level of the fungal community, the *Cysticercus* phylum was dominant. At the genus level, the dominant genera was *Saccharomyces* for all treatments. Persimmon wine with different pre-treatments had a stronger similarity in terms of their fungi during fermentation than in terms of their bacteria. In addition, fresh persimmon pulp (S), frozen persimmon pulp (D), persimmon peel (P), and persimmon pulp fermented by tannase (M) showed significant correlations between tannin content and microbial genera in the fermentation of species 10, 5, 3, and 7, respectively, with different microbial genera. Preliminarily, the raw material pretreatment would affect the tannin content and microbial correlation during the fermentation of persimmon wine.

**Key words:** high-throughput sequencing; persimmon wine; tannin content; microbial diversity

柿子原产于中国，在韩国和日本等东亚地区分布十分广泛<sup>[1-2]</sup>。据统计，2013 年柿子在全世界的种植面积达到 819167 公顷，总产量约 464 万吨，其中中国的种植面积占 90%，产量占 78%<sup>[3]</sup>。柿子含有大量的酚类物质，主要以单宁类和黄酮类为主，具有清除自由基、预防心血管疾病等功能<sup>[4-5]</sup>。目前由于加工技术水平落后等局限性，我国对柿子利用率较低，造成大量原料被浪费，因此急需开发更多柿子深加工产品<sup>[6]</sup>。现阶段主要加工形式有柿饼、柿醋和柿酒等<sup>[7]</sup>。

柿子酒是以柿子为原料酿造的果酒，具有抗衰老和降低血液胆固醇等功能，产品附加值较高，是柿子综合利用的重要途径之一<sup>[8-9]</sup>。在发酵过程中，酿酒微生物对柿子酒的品质具有十分重要的影响<sup>[10]</sup>。目前高通量测序技术因其便捷、高效等优势<sup>[11]</sup>，在白酒、葡萄酒和其他酒类的微生物多样性研究中应用广泛。Wang 等<sup>[12-15]</sup>通过高通量测序研究发现葡萄酒在发酵过程中的优势菌属为乳杆菌属。贾丽艳等<sup>[16]</sup>发现在清香型白酒中的主要优势菌属为子囊菌纲的腹膜孢酵母属、有孢汉逊酵母属、酵母属、有孢圆孢酵母属和假丝酵母属。然而目前柿子酒发酵过程中微生物多样性方面的研究尚少。

本研究以柿子为原料，考虑到柿子中单宁含量过高，影响柿子酒成品的口感和色泽。在预实验中，课题组采用冷冻、蒸煮、加入单宁酶三种方法对柿子果肉进行处理，另选取柿子果肉和柿子皮共五种原料进行发酵。结果表明三种处理方法对单宁均有不同程度的降解，经单宁酶处理的发酵酒单宁含量最低，柿子皮发酵酒的单宁含量高于柿子果肉发酵酒。此外，研究发现蒸煮过的柿子中果胶占比量上升，成品过于粘稠，若需制备发酵酒需进行二次处理。基于以上结果，本文选用柿子果肉、冻柿子果肉、柿子皮以及经过单宁酶处理的柿子果肉四种原料酿造柿子酒，通过高通量测序技术研究四种不同预处理柿子酒在发酵过程中的细菌和真菌群落结构，并对不同处理组中单宁含量和发酵时间与微生物群落组成进行相关性分析，为下一步通过微生物方法调控柿子酒中单宁含量提供理论基础，并为后期开发柿子酒原料的预处理和生产提供理论参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与仪器

成熟的火晶柿子 市售，太原市小店区农贸市场；酒曲 英联(哈尔滨)食品添加剂有限公司，曲块粉碎后过 60 目筛，-80 ℃ 冰箱保存备用；单宁酶(食品级，酶比活力 200 U/g) 北京卫诺恩生物技术有限公司；无水碳酸钠 天津市北辰方正试剂厂；福林酚 福州飞净生物科技有限公司；2×Phusion High-Fidelity PCR Master Mix 美国纽英伦生物技术公司；Ion Plus 建库试剂盒 美国赛默飞世尔公司；琼脂糖凝胶回收试剂盒 天根生化科技(北京)有限公司。

S.SW-CJ-1FD 型净化工作台 苏净集团安泰公司；DXY-6 型电热恒温水浴锅 上海百典仪器设备有限公司；HNY-200B 型摇床 欧诺仪器有限公司；D1008E 型低速离心机 安徽中科中佳科学仪器有限公司；NanoBio 200 型超微量分光光度计 奥普天成(厦门)科技有限公司；MX-S 型涡旋混合仪 北京佳航博创科技有限公司；DYY-6C 型电泳仪 北京君意东方电泳设备有限公司；NovaSeq6000 测序仪

美国 Illumina 公司；ALS 1296 聚合酶链式反应 (polymerase chain reaction, PCR) 仪、Gel Doc 2000 UV 凝胶成像系统 北京博奥晶典生物技术有限公司。

### 1.2 实验方法

#### 1.2.1 柿子酒酿造工艺流程 成熟柿子→去柄→打浆→加入酒曲→发酵→澄清→过滤→成品

操作要点：冻柿子：将成熟的柿子于-20 ℃ 条件下冷冻，打浆前将其融化；经单宁酶处理的柿子果肉：先将成熟的柿子打浆加入 2 倍质量的水混匀后，再调节其 pH 为 5，加入体积比为 0.2% 的单宁酶，在温度为 40 ℃ 的条件下水浴 100 min 后，待冷却至室温再加入酒曲。

具体方法：将成熟的柿子果肉(S)、冻柿子果肉(D)、柿子皮(P)以及经单宁酶处理的柿子果肉(M)经料理机破碎打浆，加入 2 倍质量的水后再加入 70 mg/mL 的酒曲混匀后，置于 250 mL 锥形瓶中，将其置于摇床(160 r/min, 28 ℃)中发酵 9 d，试验重复 3 次，且发酵期间每天定时对发酵液中单宁含量进行

跟踪测定。

**1.2.2 取样方法** 在超净工作台内分别采集柿子果肉(S)、冻柿子果肉(D)、柿子皮(P)以及经单宁酶处理的柿子果肉(M)发酵第1、3、5、7和9 d的样品,按照发酵天数分别记为S1~S9、D1~D9、P1~P9和M1~M9,置于-80 °C冰箱中保存备用。

**1.2.3 单宁含量的测定** 采用福林酚法<sup>[17]</sup>测定单宁含量。准确称取0.1 g没食子酸标准样品,加入到100 mL容量瓶中并定容至刻度混匀后,分别移取标准样品溶液0, 1, 3, 5, 7, 9 mL到100 mL容量瓶中,用蒸馏水定容至刻度,分别移取1 mL后依次加入5 mL水, 1 mL福林酚和3 mL碳酸钠溶液,摇至均匀后显色20 min,用蒸馏水做空白对照,在波长765 nm下测定吸光度(做三次平行试验,取平均值)。以吸光度值(A)为纵坐标,以没食子酸浓度(mg/mL)为横坐标,进行线性回归,得回归方程为y=9.1408x+0.0125, R<sup>2</sup>=0.9993。以1 mL的样品溶液代替标准品溶液进行上述试验,按下式计算样品中单宁含量。

$$\text{单宁含量}(\text{mg/mL}) = \frac{C \times N}{W \times 1000}$$

式中:C表示从标准曲线上查得的单宁酸含量(mg/mL);N表示稀释倍数;W表示样品量(mL)

**1.2.4 样品总DNA提取** 采用CTAB法对1.2.2中采集到的样品进行总DNA提取,将得到的总DNA通过1.0%琼脂糖凝胶进行电泳检测,琼脂糖凝胶电泳检测参数如下:Marker上样量2 μL,样品上样量3 μL,电泳时间40 min,琼脂糖浓度1.0%,电压100 V。

**1.2.5 PCR扩增、高通量测序及数据分析** 检测DNA的纯度和浓度合格后,以基因组DNA为模板,采用引物341F(5'-CCTACGGGNNGCWGCAG-3')/805R(5'-GACTACHVGGGTATCTAATCC-3')和1737F(5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3')和2043R(5'-GCTCGTTCTTCATCGATGC-3')分别对细菌16S rDNA V3~V4区和真菌ITS1区基因序列进行PCR扩增。PCR扩增体系30 μL: Phusion Master Mix(2×)15 μL, Primer(2 μmol/L)3 μL, gDNA(1 ng/μL)10 μL, ddH<sub>2</sub>O 2 μL。反应程序:98 °C预变性1 min, 30个循环包括(98 °C, 10 sec; 50 °C, 30 sec; 72 °C, 30 sec); 72 °C, 5 min。扩增结束后,用2%琼脂糖凝胶电泳检测,产物用GeneJET胶回收试剂盒回收。检测合格的扩增产物通过北京诺禾致源科技股份有限公司 Illumina NovaSeq 6000平台进行高通量测序。

### 1.3 数据处理

将PCR产物的原始下机序列去除barcode和引物序列,使用FLASH(V1.2.11)软件进行双端测序reads拼接。Fastp(V0.23.0)软件进行质控;Usearch

(10.0.259)软件去除嵌合体;使用QIIME2(版本2021.8)软件进行OUT划分,并进行物种注释和Alpha多样性分析;使用R软件(version 2.15.3)绘制稀释曲线和Rank abundance曲线;采用SPSS(IBM23)软件进行显著性分析;使用Origin 2019软件工具进行标准曲线图和折线图绘制。

## 2 结果与分析

### 2.1 不同预处理柿子酒发酵过程中单宁含量的变化

如图1所示,柿子酒发酵过程中单宁含量均呈现先增加后逐渐下降的变化趋势。原因可能是在发酵初期,酒曲的加入使得发酵液的酸度增大,而在酸性条件下,单宁更容易从细胞中溢出。之后,随着发酵不断进行,单宁发生氧化,其含量又逐渐降低。研究得出经过单宁酶处理的柿子果肉(M)在柿子酒发酵过程中的单宁含量最低,其次是冻柿子果肉(D)、柿子果肉(S)和柿子皮(P)。

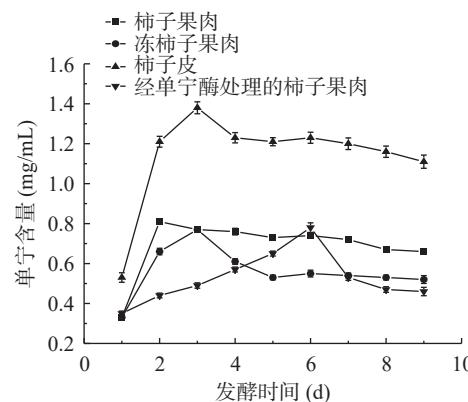


图1 发酵时间对柿子不同预处理发酵的影响

Fig.1 Effects of fermentation time on different pretreatment fermentation of persimmon

### 2.2 不同预处理柿子酒发酵过程中的稀释曲线分析

采用样品稀释曲线判断不同样品物种多样性是否饱和,并比较不同样本间的物种多样性。如图2a所示,在柿子果肉(S)发酵中,S3、S5、S9样品随着测序深度的增加,物种的数量有明显上升,其细菌稀释曲线在超过60000时达到平稳,而S1、S7与S3、S5、S9样品相比物种上升较为平缓,超过40000时趋于平稳;在冻柿子果肉(D)、柿子皮(P)以及经单宁酶处理的柿子果肉(M)发酵中,细菌稀释曲线均在超过40000时趋于平坦,说明样品测序数据量合理,测序数据足够;如图2b所示,在经单宁酶处理的柿子果肉中,M3、M5、M7、M9样品随测序深度的增加,物种的数量上升速度缓慢,其真菌稀释曲线在超过10000时趋于平稳,而M1样品与其它相比物种数量上升较快,当真菌稀释曲线在超过40000时趋于稳定。柿子果肉(S)、冻柿子果肉(D)和柿子皮(P)发酵中,真菌稀释曲线在超过40000时趋于平稳,说明测序结果已经足够反映当前样本的多样性,再增加测序深度也无法检测到更多的物种<sup>[18]</sup>。

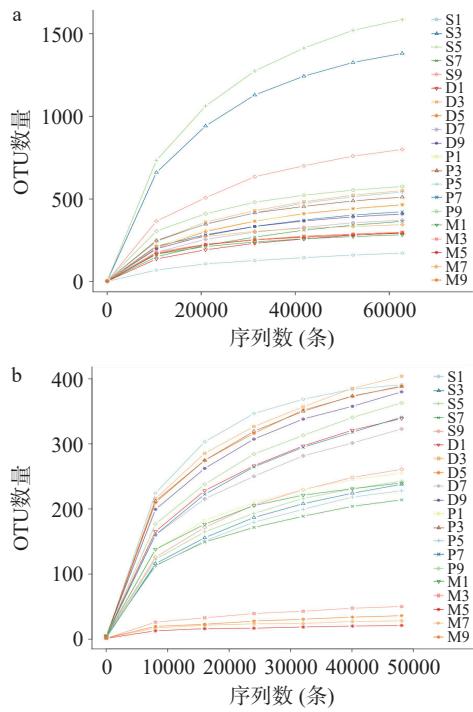


图 2 不同样品的稀释曲线

Fig.2 Dilution curve of different samples

注: a: 细菌, b: 真菌; 图 3、图 8 同。

### 2.3 不同预处理柿子酒发酵过程中的丰度等级聚类曲线分析

等级聚类曲线主要反映的是每个样本中不同物种丰度的分布规律。若曲线在横轴上的跨度较大，则说明物种的丰富度越高；若曲线越平缓，则说明物种的分布越均匀<sup>[19]</sup>。如图 3a、图 3b 所示，S1、D1、M1 的细菌等级聚类曲线和 M3、M5、M7、M9 的真菌等级聚类曲线陡峭水平跨度小，物种丰富度和均匀度低，而其他样品的丰富度和均匀度较高。

### 2.4 微生物种群结构分析

#### 2.4.1 不同预处理柿子酒细菌种群在门水平上的组成

四种不同预处理柿子酒发酵过程中细菌种群在

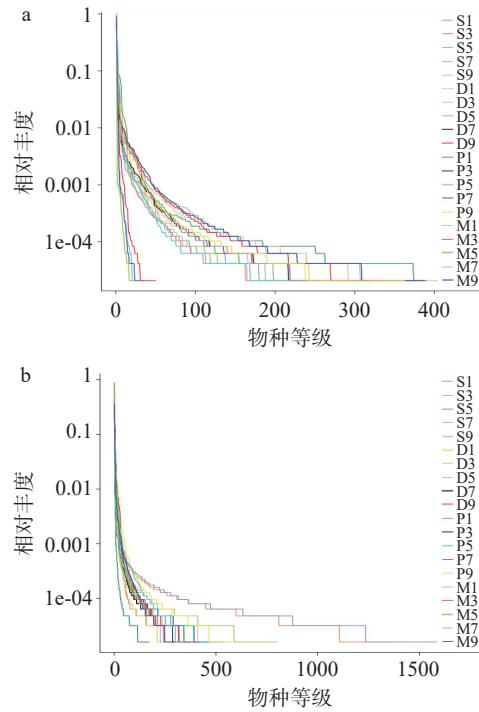


图 3 不同样品的丰度等级聚类曲线

Fig.3 Clustering curves of abundance grades of different samples

门水平上的组成如图 4 所示，细菌类群排名前 5 的是变形菌门(Proteobacteria)，蓝藻菌门(Cyanobacteria)，厚壁菌门(Firmicutes)，未知细菌菌门(unidentified\_Bacteria)，拟杆菌门(Bacteroidota)。

S1、D1、P1、M1 样品的优势菌门均为蓝藻菌门，它可能来自原料柿子中的叶绿体<sup>[20]</sup>。在柿子果肉(S)发酵中，微生物群落结构发生明显的改变，蓝藻菌门显著下降，其中 S1 样品中蓝藻菌门的相对丰度为 87%，S9 样品中的相对丰度为 0.4%，并且在 S3 样品中第一优势菌门由相对丰度为 2.38% 的蓝藻菌门转变为相对丰度为 78.35% 的厚壁菌门，其原因可能是由于发酵时间的延长，抗逆性较差的微生物生长受到限制，但厚壁菌门的抗逆性较强，从而成为优势菌

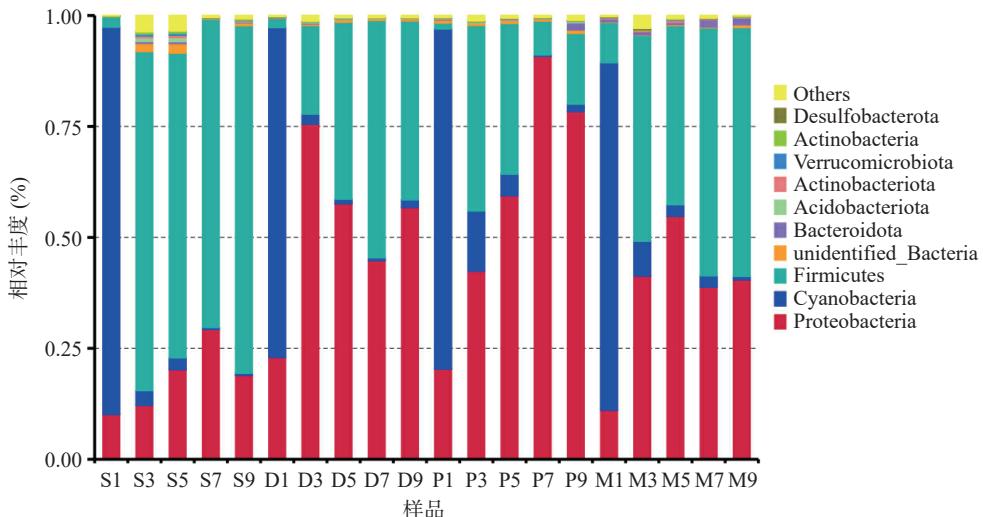


图 4 不同样品的细菌种群在门水平上的分布

Fig.4 Distribution of bacterial populations in different samples at the gate level

门。冻柿子果肉(D)和经单宁酶处理的柿子果肉(M)在发酵第1d后的优势菌门主要为厚壁菌门和变形菌门,柿子皮(P)发酵酒在发酵第3d到第9d的优势菌门逐渐变为变形菌门,并且蓝藻细菌门的相对丰度也在一直下降,可能是由于随着时间的延长,越来越不利于蓝藻细菌门的生长,造成这一差别的原因可能是样品中过高浓度的单宁会抑制微生物的生长<sup>[21]</sup>。韩国强等<sup>[22]</sup>发现清香型白酒中在发酵中的主要优势细菌门为厚壁菌门、变形菌门,这说明果酒发酵与白酒发酵过程中的微生物有着一定程度的相似性。在细菌群落中,各发酵阶段的样品中仍有一些未鉴定的细菌(unidentified\_Bacteria),这类菌群无法从数据库中注释出来,它很有可能是在其他环境中也出现过但不可培养的细菌,这些细菌门的功能还有待进一步研究<sup>[23]</sup>。

**2.4.2 不同预处理柿子酒细菌种群在属水平上的组成** 四种不同预处理柿子酒发酵过程中细菌种群在属水平上的组成如图5所示,细菌类群排名前5的是未知叶绿体(unidentified\_Chloroplast),片球菌属

(*Pediococcus*),醋菌属(*Acetobacter*),寡养单胞菌属(*Stenotrophomonas*),葡糖杆菌属(*Gluconobacter*)。

S1、D1、P1、M1样品的优势菌属均为未知叶绿体。在柿子果肉(S)发酵中,S3、S5、S7、S9样品的优势菌属均为片球菌属,且S9样品中片球菌属达到最高值其相对丰度为62.89%。片球菌属是柿子酒酿造过程中不可或缺的部分,在柿子酒发酵过程中具有促进作用并维持酿酒微生态环境的作用,抑制杂菌生产,提高出酒率,在发酵过程具有重要的生物学结构调控功能<sup>[23]</sup>。明串珠菌属主要作用在冻柿子果肉(D)和柿子皮(P)发酵前期,明串珠菌属原产于植物中,通常在发酵的最初阶段占据主导地位,能够使酒的口感更佳,但不能耐受酒精,从而解释了其在酒精浓度较高的发酵后期丰度较低的现象<sup>[24-25]</sup>。在经单宁酶处理的柿子果肉(M)发酵中,M3和M9的优势菌属为片球菌属和葡糖杆菌属。

**2.4.3 不同预处理柿子酒真菌种群在门水平上的组成** 四种不同预处理柿子酒发酵过程中真菌种群在门水平上的组成如图6所示,真菌类群排名前5的是

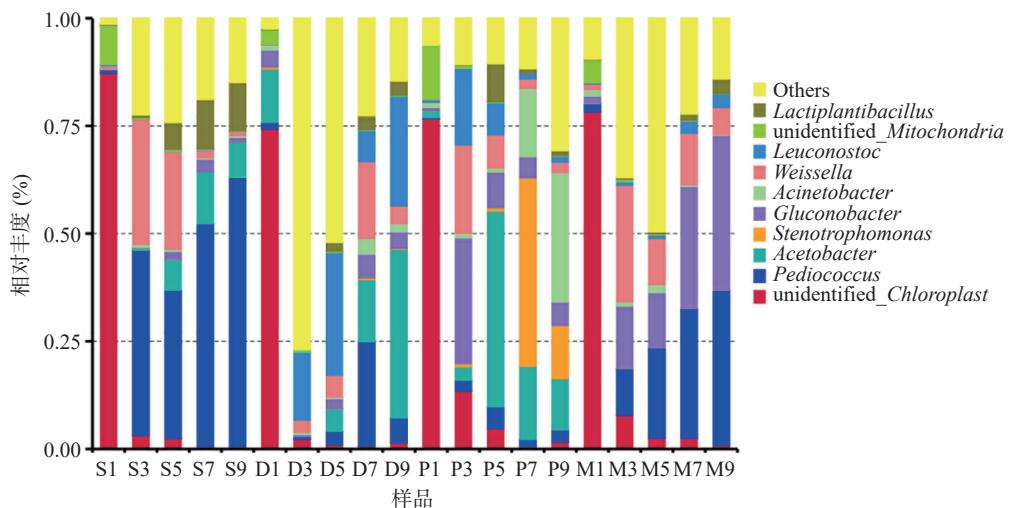


图5 不同样品的细菌种群在属水平上的分布

Fig.5 Distribution of bacterial populations in different samples at genus level

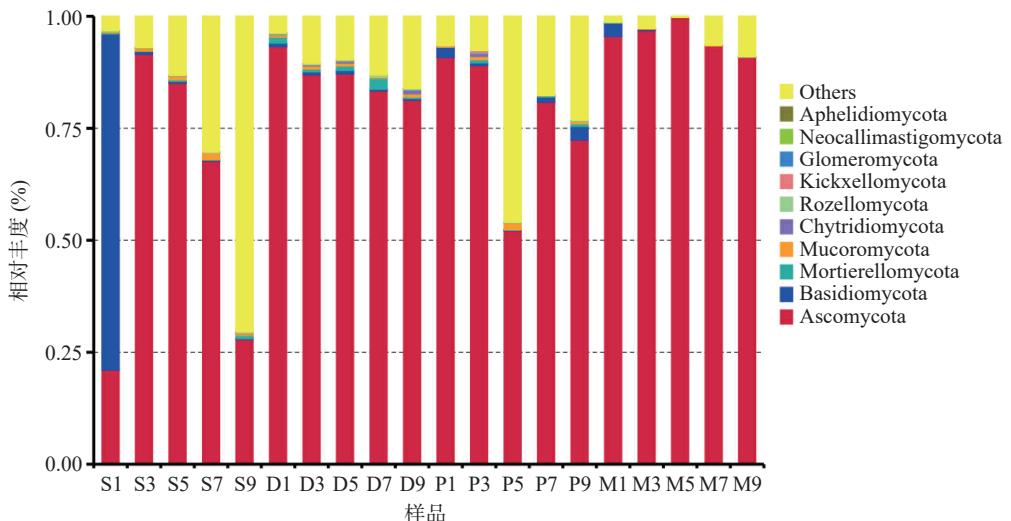


图6 不同样品的真菌种群在门水平上的分布

Fig.6 Distribution of fungal populations in different samples at the phylum level

是子囊菌门(Ascomycota), 担子菌门(Basidiomycota), 被孢霉门(Mortierellomycota), 被孢菌门(Mucromycota), 壶菌门(Chytridiomycota)。

在柿子果肉(S)发酵中, S1 样品的优势菌门为担子菌门, 其相对丰度为 75%, 但在 S3 样品中担子菌门的相对丰度降到 0.6%, 其可能来自原料或者发酵剂, 在高酸和高醇度条件下生长代谢缓慢, 因此其相对丰度较低<sup>[22]</sup>。子囊菌门为 S3 样品的优势菌其相对丰度为 91.5%, 随后呈现出下降的趋势, 在 S9 样品中达到最低丰度为 27.9%。而冻柿子果肉(D)、柿子皮(P)和经单宁酶处理的柿子果肉(M)在发酵过程中子囊菌门一直处于绝对优势菌门, 这一结果表明该真菌门能够适应发酵环境, 且对柿子酒的酿造产生影响。张源等<sup>[26]</sup>利用高通量测序技术分析了草莓酒发酵初、中、末期真菌群落的变化。结果显示, 接合菌门、子囊菌门和担子菌门是草莓酒发酵过程中的主要真菌门。对比可知, 果酒在发酵过程中的微生物变化既有相同之处也有不同之处, 可能是由于原料和预处理方式等的不同所导致, 有研究表明子囊菌门也是清香型<sup>[27]</sup>、浓香型<sup>[28]</sup>酿造的主要真菌, 说明子囊菌门在酒的发酵过程起着重要作用。

#### 2.4.4 不同预处理柿子酒真菌种群在属水平上的组成

四种不同预处理柿子酒发酵过程中真菌种群在属水平上的组成如图 7 所示, 真菌类群排名前 5 的是复膜孢酵母属(*Saccharomyopsis*)、地衣脐菇属(*Lichenomphalia*)、兰伯盘菌属(*Lambertella*)、毕赤酵母属(*Pichia*)、拟茎点霉属(*Phomopsis*)。

在柿子果肉(S)发酵中, S1 样品的优势菌属为地衣脐菇属, 相对丰度为 73.6%, S3 样品的优势菌属主要为复膜酵母属相对丰度为 84.8%, 随后呈现出下降的趋势, 在 S9 样品中复膜酵母属相对丰度达到最低值为 19%。在冻柿子果肉(D)发酵中, D5 样品的复膜酵母菌属相对丰度值最高为 72.6%, D1 样品

的复膜酵母菌属的丰度值为 23.9%, 相比于 S1 样品和 P1 样品中的复膜酵母菌属丰度更大, 原因可能是由于柿子果肉在低温下条件进行无氧呼吸, 产生酒精。在柿子皮(P)发酵中, P1 样品的优势菌属为拟茎点霉属, 这可能是来源于柿子皮上的果蒂, P7 样品和 P9 样品的优势菌属为复膜酵母菌属, 可促进微生物的繁殖及产酒生香气。在经单宁酶处理的柿子果肉(M)发酵中, M1 样品的优势菌属为兰伯盘菌属相对丰度为 54.9%, 后期复膜酵母菌属一直为优势菌属, M5 样品中达到最高相对丰度为 99.5%。在柿子酒的发酵中, 酵母菌属是以柿子为原料发酵过程中的一个重要真菌属, 它具有将糖转化为酒精的重要功能, Lu 等<sup>[29]</sup>在研究柿子自然发酵过程中也观察到同样的现象。此外, 有些酵母菌属的代谢产物是酯类物质, 从而赋予酒产生不同的风味<sup>[30]</sup>。但是以小麦为发酵剂的绍兴黄酒发酵中的主要真菌为曲霉菌、链格孢菌和嗜热菌<sup>[31]</sup>; 酱香型白酒中普遍存在的优势真菌为毕赤酵母<sup>[32]</sup>。由此说明, 酿酒原料、发酵剂、不同地理环境及加工工艺对酒的微生物区有明显影响。

#### 2.5 $\beta$ -多样性分析

主坐标分析可以用来研究样本群落组成的相似性或差异性。PCoA 分析结果见图 8。如图 8a 所示, 细菌第一主成分(PCI)贡献率为 58.7%, 第二主成分为 19.79%; S1、D1、M1、P1 样品之间分离不明显, 说明这四种不同预处理柿子酒发酵的第 1 d 样品中其细菌组成具有较强的相似性, 而其他样品细菌群落之间的差异性较大。如图 8b 所示, S1、D1、M1、P1 样品之间的真菌群落组成差异性较大, 而其它样品较为聚集, 甚至出现重叠现象, 说明这四种不同预处理柿子酒除了发酵第 1 d 的样品, 其它样品在发酵过程中的真菌组成相似性较强。

#### 2.6 Spearman 相关性分析

本研究中 Spearman 相关性分析以四种不同预

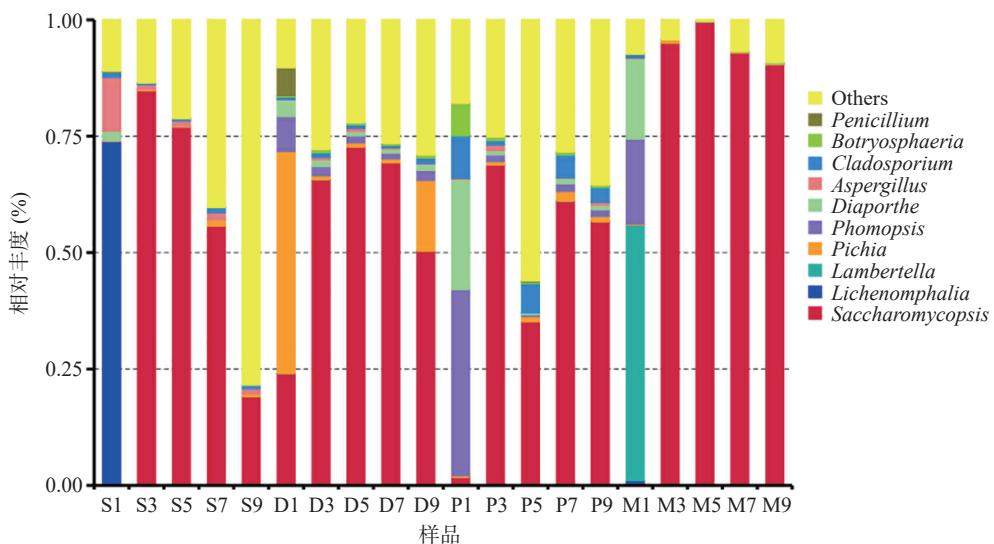


图 7 不同样品的真菌种群在属水平上的分布

Fig.7 Distribution of fungal populations in different samples at genus level

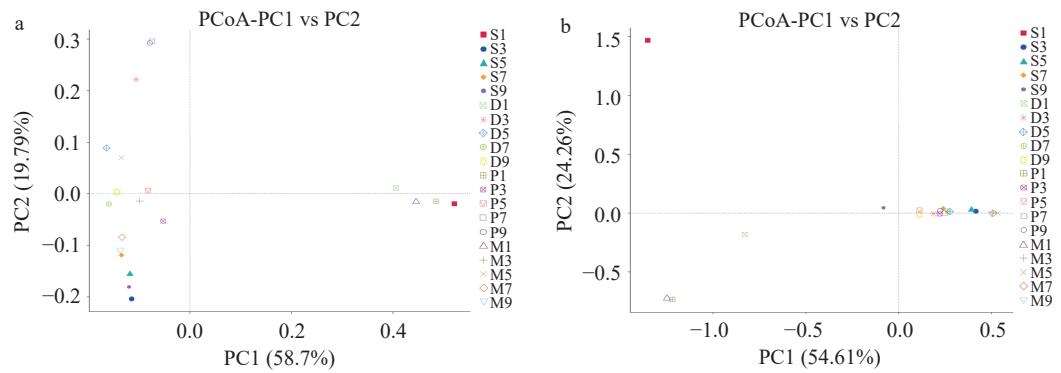


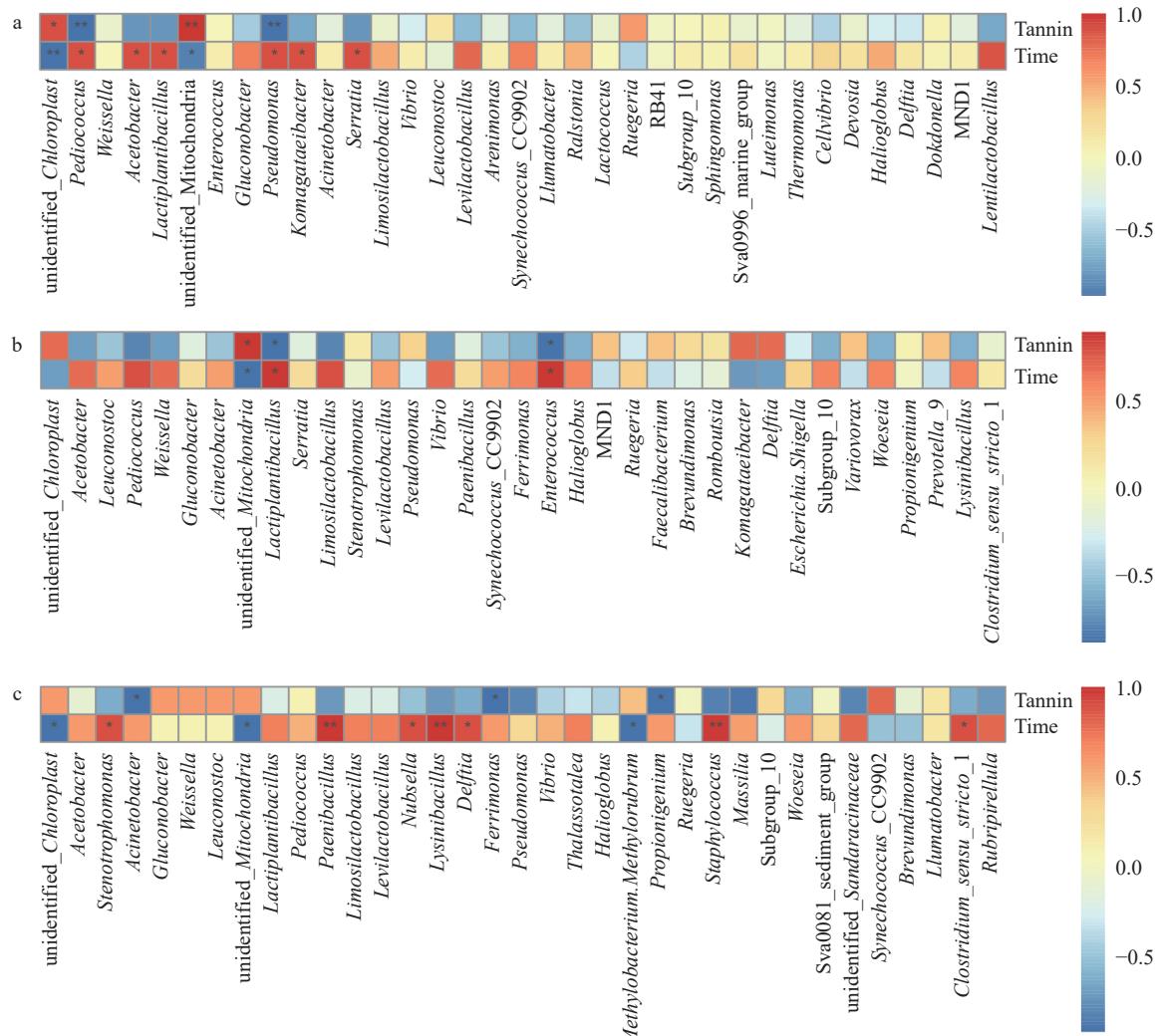
图 8 不同样品的主坐标分析

Fig.8 Principal coordinate analysis of different samples

处理柿子酒发酵过程中的单宁含量和发酵时间作为环境因子,与物种进行相关性分析。

**2.6.1 不同预处理柿子酒中的单宁含量和发酵时间与细菌属之间的相关性** 图 9a、图 9b、图 9c、图 9d 为不同预处理柿子酒中的单宁含量和发酵时间与细菌属之间的相关性。在柿子果肉(S)发酵中,片球菌属、假单胞菌属与单宁含量呈显著相关( $P<0.05$ ),其中片球菌属和假单胞菌属与单宁含量呈极显著负相关( $P<0.01$ )。此外,片球菌属、醋酸杆菌属、植物乳植杆菌属、假单胞菌属、木质醋酸菌属、沙雷氏菌属

与发酵时间呈显著正相关( $P<0.05$ )。在冻柿子果肉(D)发酵中,乳酸杆菌属、肠球菌属均与单宁含量和发酵天数显著相关( $P<0.05$ )。在柿子皮(P)发酵中,不动杆菌属、铁还原单胞菌属、丙酸菌属与单宁含量呈显著负相关( $P<0.05$ ),寡养单胞菌属、类芽孢杆菌属、*Nubsella*、赖氨酸芽孢杆菌属、代尔夫特菌属、葡萄球菌属与发酵时间呈显著正相关( $P<0.05$ ),其中类芽孢杆菌属、赖氨酸芽孢杆菌属、代尔夫特菌属与发酵时间呈极显著正相关( $P<0.01$ )。在经单宁酶处理的柿子果肉(M)发酵中,粪杆菌属、沙雷氏菌属与单



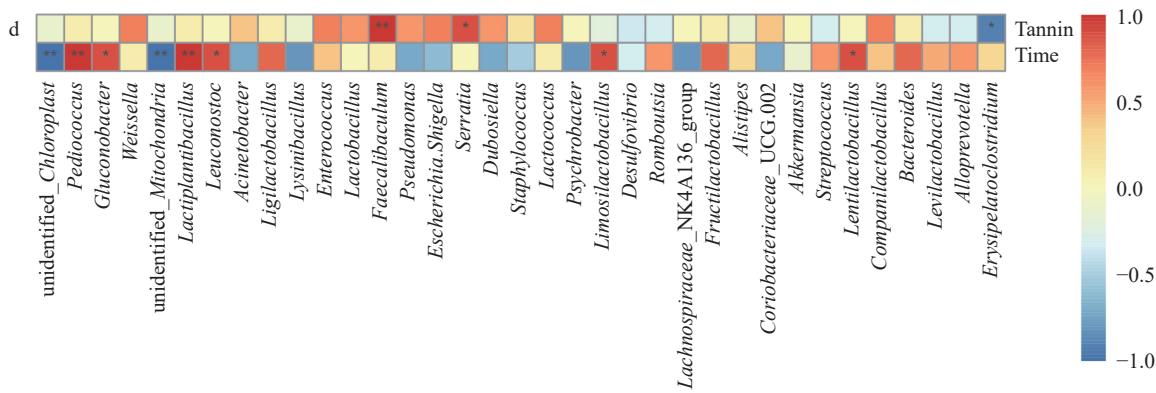


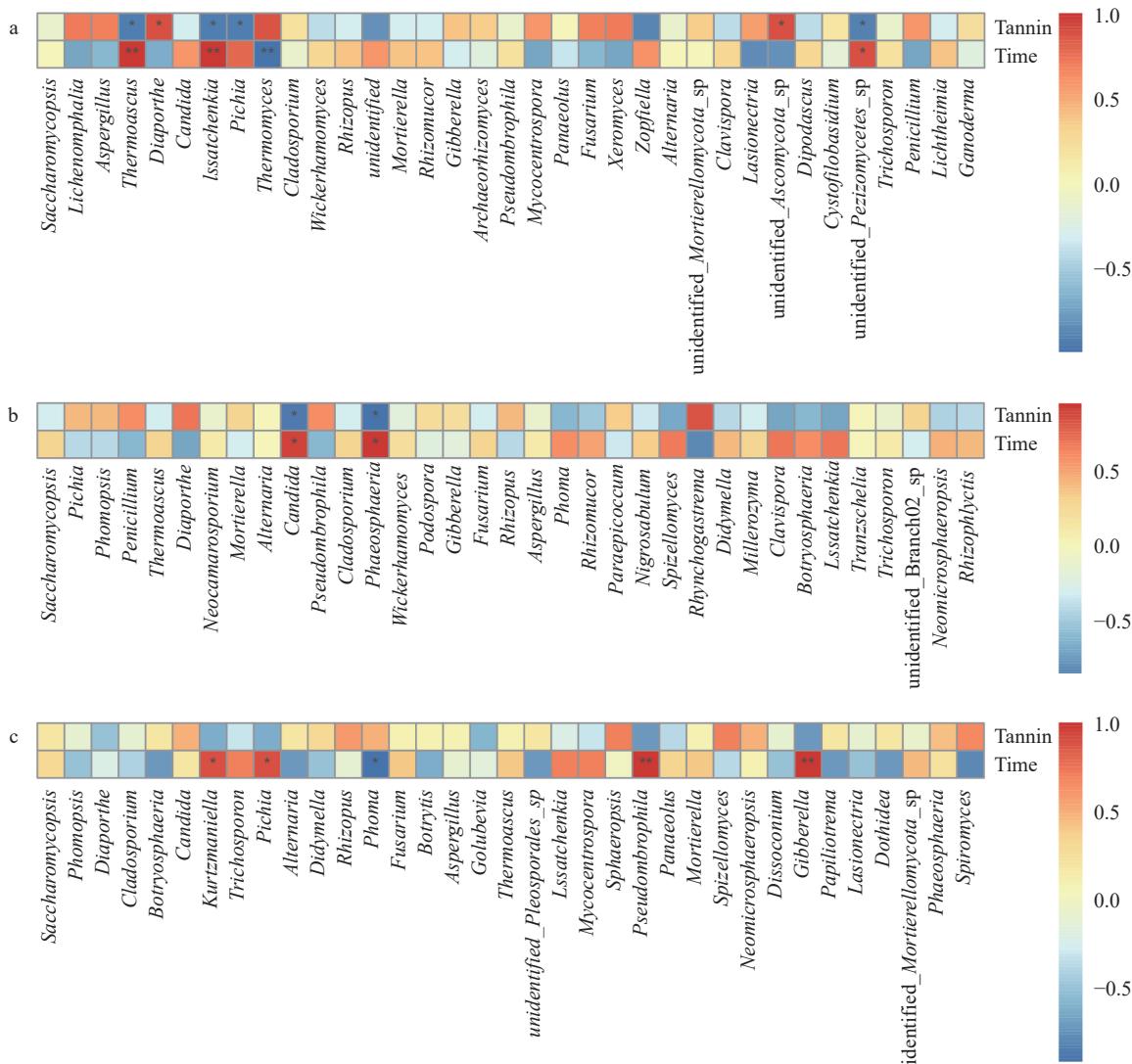
图9 柿子不同预处理柿子酒发酵过程中的单宁含量和发酵时间与细菌属水平的相关性分析

Fig.9 Correlation analysis of tannin content, fermentation time and bacterial genus levels in persimmon wine with different pretreatments

注: a、b、c、d 分别表示柿子果肉发酵、冻柿子果肉发酵、柿子皮发酵、经单宁酶处理的柿子果肉发酵;标\*表示显著性检验  $P<0.05$ ; 图 10 同。

宁含量呈显著正相关( $P<0.05$ ),片球菌属、葡萄糖杆菌属、植物乳杆菌、明串珠菌属、发酵粘液乳杆菌、迟缓乳杆菌属与发酵时间呈显著正相关( $P<0.05$ ),其中片球菌属、葡萄糖杆菌属与发酵时间呈极显著正相关。

2.6.2 不同预处理柿子酒中的单宁含量和发酵时间与真菌属之间的相关性 图 10a~图 10d 为不同预处理柿子酒中的单宁含量和发酵时间与真菌属之间的相关性。在柿子果肉(S)发酵中,嗜热子囊菌属、间座壳属、伊萨酵母属、毕赤酵母属、与单宁含量显著



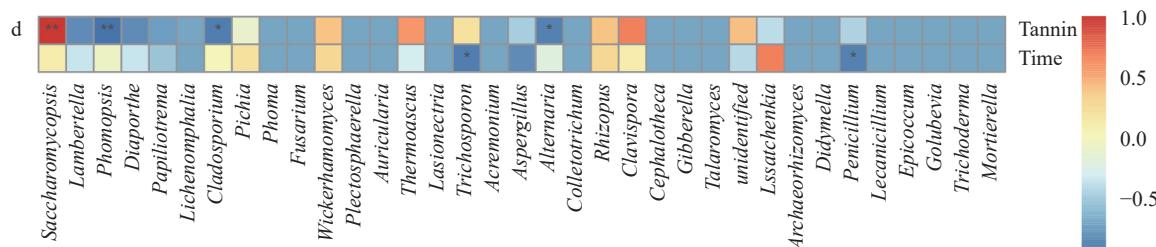


图 10 柿子不同预处理柿子酒发酵过程中的单宁含量和发酵时间与真菌属水平的相关性分析

Fig.10 Correlation analysis of tannin content, fermentation time and fungal level in persimmon wine with different pretreatments

相关( $P<0.05$ ), 其中嗜热子囊菌属和伊萨酵母属与发酵时间呈极显著正相关( $P<0.01$ )。在冻柿子果肉(D)发酵中, 念珠菌属、球腔菌属均与单宁含量和发酵天数呈显著相关( $P<0.05$ ), 并与单宁含量呈显著负相关( $P<0.05$ ), 与发酵天数呈显著正相关( $P<0.05$ )。在柿子皮(P)发酵中, *Kurtzmaniella*、毕赤酵母属、假雨盘菌属、赤霉菌属与发酵呈显著正相关( $P<0.05$ )。在经单宁酶处理的柿子果肉(M)发酵中, 复膜孢酵母属与单宁含量呈极显著正相关( $P<0.01$ ); 毛孢子菌属和青霉菌属与发酵时间呈显著负相关( $P<0.05$ )。

### 3 结论

本研究对柿子不同预处理发酵柿子酒的单宁含量变化进行研究, 发现经单宁酶处理的柿子果肉(M)在发酵中单宁含量最低, 其次是冻柿子果肉(D), 柿子果肉(M), 柿子皮(P); 并应用高通量测序方法研究其发酵过程中的微生物多样性, 明确柿子不同预处理发酵期间的优势菌种类。研究发现, 在门水平上, 蓝藻菌门(Cyanobacteria)是四种不同预处理柿子酒在发酵第1 d的主要优势细菌门, 发酵后期主要的优势细菌门为厚壁菌门(Firmicutes)和变形菌门(Proteobacteria), 而子囊菌门一直是柿子酒发酵过程中的主要优势真菌门; 在属水平上, 柿子果肉(S)、冻柿子果肉(D)、柿子皮(P)、经单宁酶处理的柿子果肉(M)的优势细菌属分别片球菌属(*Pediococcus*)、明串珠菌属(*Leuconostoc*)、不动杆菌属(*Acinetobacter*)、葡糖杆菌属(*Gluconobacter*)和片球菌属(*Pediococcus*), 而优势真菌属均为复膜酵母菌属(*Saccharomyces*), 与细菌相比, 各柿子酒在发酵中真菌具有更强的相似性。此外, 在冻柿子果肉(D)发酵中, 单宁含量和发酵时间均与乳酸杆菌属、肠球菌3个细菌属和念珠菌属、球腔菌属2个真菌属呈显著相关性, 而其它三种预处理发酵的柿子酒中单宁含量和发酵时间与细菌属和真菌属的显著相关性有明显的差异。

本研究对柿子酒的生产具有一定的理论指导和实际应用价值, 并为下一步通过微生物方法调控柿子酒中单宁含量提供了理论基础。在今后的研究中, 可对柿子酒酿造工艺做进一步优化, 并根据微生物群落结构演替规律, 对发酵过程中的理化指标和风味特征等进行相关性分析, 从而为柿子酒的品质改善提供理论支持。

### 参考文献

- [1] LUO Z, WANG R. Persimmon in China: Domestication and traditional utilizations of genetic resources[J]. Advances in Horticultural Science, 2008, 22(4): 239–243.
- [2] XIA L H, CHEN Y L, FENG Y B, et al. Breeding report of a new persimmon cultivar Heishi No. 1[J]. Agricultural Science and Technology, 2017, 18(4): 632–634.
- [3] LAMIKANRA O. Fresh-cut fruits and vegetables: Science, technology and market[M]. USA: CRC Press, 2002: 1.
- [4] ZHU W, ZHU B, LI Y, et al. Acidic electrolyzed water efficiently improves the flavour of persimmon (*Diospyros kaki* L. cv. Mopan) wine[J]. Food Chemistry, 2016, 197(partA): 141–149.
- [5] MIAOMIAO LIU, KUN YANG, YIMAN QI, et al. Fermentation temperature and the phenolic and aroma profile of persimmon wine[J]. Journal of the Institute of Brewing, 2018, 124(3): 269–275.
- [6] 冯娟, 张鹏, 李江阔, 等. 柿子加工产品研究进展[J]. 保鲜与加工, 2020, 20(3): 204–209. [FENG J, ZHANG P, LI J, et al. Research progress on persimmon processed products[J]. Storage and Process, 2020, 20(3): 204–209.]
- [7] 陈凌波. 柿子果酒的发酵工艺及残渣再利用的研究[D]. 天津: 天津科技大学, 2019. [CHEN L B. Study on fermentation technology and residue of persimmon fruit wine[D]. Tianjin: Tianjin University of Science and Technology, 2019.]
- [8] 贾翠英, 杨天佑, 刘琳, 等. 柿子酒中非花色苷酚物质的提取及组成分析[J]. 食品工业科技, 2010, 31(10): 158–160+172. [JIA C Y, YANG D Y, LIU L, et al. Extraction and analysis of non-anthocyanin phenolics in persimmon wine[J]. Science and Technology of Food Industry, 2010, 31(10): 158–160+172.]
- [9] HWANG J T, HAN C K, CHOI S Y, et al. Protective effect of dealcoholized persimmon wine on  $H_2O_2$ -induced oxidative injury in H9c2 cardiomyocytes[J]. Journal of Food Research, 2013, 2(4): 61–67.
- [10] 范民婷, 姜东琪, 张云舒, 等. 黑树莓酒自然发酵过程中微生物群落演替研究[J]. 中国酿造, 2020, 39(9): 91–96. [FAN M T, JIANG D Q, ZHANG Y S. Analysis of microbial community succession during spontaneous fermentation of black raspberry wine[J]. China Brewing, 2020, 39(9): 91–96.]
- [11] 张晓蒙, 李德美, 金玮鋆, 等. 西藏青稞酒酿造小曲微生物多样性分析[J]. 中国酿造, 2018, 37(9): 28–33. [ZHANG X M, LI D G, JIN W J, et al. Analysis of microbial diversity of tibet highland barley wine distiller's yeast based on high-throughput sequencing technology[J]. China Brewing, 2018, 37(9): 28–33.]
- [12] WANG C, DAVID G F, ALBERT M, et al. Fungal diversity in grape must and wine fermentation assessed by massive sequencing, quantitative PCR and DGGE[J]. Frontiers in Microbiology, 2015, 6(1156): 1156.
- [13] FILIPPIS F D, STORIA A L, BLAIOTTA G. Monitoring the mycobiota during Greco di Tufo and Aglianico wine fermentation by

- 18S rRNA gene sequencing[J]. *Food Microbiology*, 2017, 63: 117–122.
- [14] MARIA, DEL, CARMEN, et al. Analysis of microbial diversity and dynamics during wine fermentation of Grenache grape variety by high-throughput barcoding sequencing[J]. *LWT Food Science & Technology*, 2016, 72.
- [15] HAILAN P, ERIK H, SCOTT K, et al. Insights into the bacterial community and its temporal succession during the fermentation of wine grapes[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2015(6): 809.
- [16] 贾丽艳, 田宇敏, 王晓勇, 等. 传统清香型白酒发酵过程中真菌群落结构及其动态演替[J]. 中国食品学报, 2020, 20(10): 303–308. [JIA L Y, TIAN Y M, WNAG X Y, et al. Community and change of fungi in fermentation process of the traditional light-aroma Baijiu[J]. *Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology*, 2020, 20(10): 303–308.]
- [17] 张天英. 柿子酒发酵过程中营养组分及单宁的变化研究[D]. 新乡: 河南科技学院, 2012. [ZHANG T Y. Chang of physical and chemical compositions and tannin in the fermentation[D]. Xinxiang: Henan Institute of Science and Technology, 2012.]
- [18] WANG Y, SHENG H F, HE Y, et al. Comparison of the levels of bacterial diversity in freshwater, intertidal wetland, and marine sediments by using millions of illumina tags[J]. *Applied & Environmental Microbiology*, 2012, 78(23): 8264–8271.
- [19] LUNDBERG D S, YOURSTONE S, MIECZKOWSKI P, et al. Practical innovations for high-throughput amplicon sequencing[J]. *Nat Meth*, 2013, 10(10): 999–1002.
- [20] 王涵钰. 玉米酒发酵过程中微生物多样性及风味品质研究[D]. 贵阳: 贵州大学, 2021. [WANG H Y. Study on microbial diversity and flavor quality of corn wine during fermentation[D]. Guiyang: Guizhou University, 2021.]
- [21] 杨玲, 王琪, 郭旭凯, 等. 高粱单宁含量对清香型大曲白酒酒醅中细菌种群的影响[J]. 中国酿造, 2020, 39(7): 83–88. [YANG L, WANG Q, GUO X K, et al. Effect of sorghum on bacterial community in fermented grains of Fen-flavor Daqu Baijiu[J]. *China Brewing*, 2020, 39(7): 83–88.]
- [22] 韩国强, 孙协平, 吴鹏飞, 等. 基于高通量测序分析复配小曲白酒发酵过程中微生物群落结构及多样性[J]. 食品科学, 2021, 42(18): 80–85. [HAN G Q, SUN X P, WU P F, et al. High throughput sequencing-based analysis of microbial community structure and diversity during Baijiu fermentation with miced-strain xiaoqu[J]. *Food Science*, 2021, 42(18): 80–85.]
- [23] 邢敏钰, 杜海, 徐岩. 芝麻香型白酒发酵过程中乳酸菌多样性及其演替规律[J]. 微生物学通报, 2018, 45(1): 19–28. [XING M Y, DU H, XU Y. Diversity and succession of lactic acid bacteria during sesame-flavor liquor fermentation[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2018, 45(1): 19–28.]
- [24] AMPE F, OMAR N B & MOIZAN C, et al. Polyphasic study of the spatial distribution of microorganisms in Mexican Pozol, a fermented maize dough, demonstrates the need for cultivation-independent methods to investigate traditional fermentations[J]. *Applied & Environmental Microbiology*, 1999, 65(12): 5464–5473.
- [25] STILES M E & WILHELM H H. Lactic Acid Bacteria of foods and their current taxonomy[J]. *International Journal of Food Microbiology*, 1997, 36: 1–29.
- [26] 张源, 孙晓璐, 兰伟, 等. 草莓酒自然发酵过程中的真菌群落分析[J]. 阜阳师范学院学报(自然科学版), 2018, 35(2): 21–26, 42. [ZHANG Y, SONG X L, LAN W, et al. Dynamic analysis on fungal community of naturally fermented strawberry wine[J]. *Journal of Fuyang Teachers College (Natural Science Edition)*, 2018, 35(2): 21–26, 42.]
- [27] 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.
- [28] 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*, 2007, 113(1): 21–27.
- [29] LU Y, GUAN X L, LI R B, et al. Comparative study of microbial communities and volatile profiles during the inoculated and spontaneous fermentation of persimmon wine[J]. *Process Biochemistry*, 2021, 100: 49–58.
- [30] 成林, 成坚, 王琴, 等. 酒曲微生物菌群对酿造酒产品风味影响的研究进展[J]. 中国酿造, 2020, 39(10): 1–4. [CHEN L, CHENG J, WANG Q, et al. Research progress on the effect of Jiuqu microbial flora on the flavor of brewed alcoholic drink[J]. *China Brewing*, 2020, 39(10): 1–4.]
- [31] JI Z W, JIN J S, YU G S, Mou Y R, et al. Characteristic offilamentous fungal diversity and dynamics associated with wheat Qu and the traditional fermentation of Chinese rice wine[J]. *International Journal of Food Science & Technology*, 2018, 53(7): 1611–1621.
- [32] ZHANG H X, WANG L, TAN Y W, et al. Effect of Pichia on shaping the fermentation microbial community of sauce-flavor-Baijiu-ScienceDirect[J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2020, 336.