中国传统酿造食品微生物生态学及其研究策略

张晓娟^{1,2}, 陆震鸣^{1,2}, 柴丽娟², 史劲松³, 许正宏^{1,2*}

1. 江南大学生物工程学院, 工业生物技术教育部重点实验室, 无锡 214122;

2. 江南大学粮食发酵工艺与技术国家工程实验室, 无锡 214122;

3. 江南大学药学院, 无锡 214122

* 联系人, E-mail: zhenghxu@jiangnan.edu.cn

收稿日期: 2018-11-08; 接受日期: 2019-01-30; 网络版发表日期: 2019-05-14

国家自然科学基金(批准号: 31771967)、国家重点研发计划(批准号: 2016YFD0400505)和国家轻工技术与工程一流学科自主课题(批准号: 2018-11)资助

摘要 中国传统酿造食品的生产通常是在开放度高、周围环境条件粗放、微生物群落结构时空差异显著批次间变化规律类似的微生态环境中进行的。其过程具有生产原料成分多样、参与的微生物种类多、代谢反应复杂、工艺繁复以及产品组分复杂等特征, 从而导致科学阐释其过程代谢机理存在着巨大的挑战。基因组学、转录组学等组学技术以及基于现代检测技术的代谢组学方法的发展和应用, 为应用微生物生态学方法研究其过程的微生物群落结构与功能、群落内部以及与环境的作用规律提供了有力的支撑。本文结合本研究团队前期研究工作, 综述了近年来传统酿造食品微生物生态学的研究进展, 从系统解析酿造微生物群落结构与代谢功能入手, 解析微生物群落及个体功能并实现理性调控的传统酿造微生物群落研究策略, 包括把握微生物群落三个要素: 结构、功能、调控; 解析好两个互动: 酿造群落内的交互作用, 群落与外部环境的交互作用; 抓住一个关键: 群落中的关键核心功能微生物(群)。在上述基础上努力实现传统食品酿造过程中的微生物功能可控、酿造过程可控和产品品质可控的三个目标。

关键词 中国传统酿造食品, 微生态, 微生物群落, 代谢功能调控

在人类文明的发展历程中, 因自然环境、文化习俗等不同原因致使食物制作技艺与饮食文化呈现多样性的特点。这些相对独立发展形成的各类型饮食文化中, 传统酿造食品都为重要组成部分。传统发酵食品技艺也从以延长食物保质期为目的的自然发酵, 逐步演变为生产多种不同风格食品的生产技术, 如奶酪、酒、醋、酱油、发酵肉制品、泡菜等颇具民族、区域及时代特征的生产工艺。这些工艺的开发和演变与人

类的文明数千年的发展历程紧密相伴, 已成为体现其独特的文化符号^[1,2]。我国传统酿造食品同样具有这些独特属性, 在现代工业高度发展的今天, 仍以其独特的魅力被大家广泛接受和喜爱, 在国民的日常生活及经济发展中具有非常重要的地位。

中国的白酒、食醋、酱油、料酒、腐乳、酱、泡菜等传统酿造食品的生产工艺有悠久的历史。相传在夏禹时期的仪狄就发明了酿酒, 《吕氏春秋》就记载

引用格式: 张晓娟, 陆震鸣, 柴丽娟, 等. 中国传统酿造食品微生物生态学及其研究策略. 中国科学: 生命科学, 2019, 49: 575–584
Zhang X J, Lu Z M, Chai L J, et al. Research strategies for microbial ecology of traditional chinese fermented foods (in Chinese). Sci Sin Vitae, 2019, 49: 575–584, doi: 10.1360/N052018-00255

了“仪狄作酒”，《周礼》也有关于酱、醋等发酵食品的记载。在数千年的传承中，先人从偶然发现到通过实践不断总结，最终形成了独特、复杂又精妙控制的酿造技艺。这些传统技艺实现了在酿造过程中的特定节点调整与微生物代谢和生长密切相关的环境因素（发酵过程中湿度、酸度、氧气浓度等），实现对发酵过程适时适度的人工干预。例如，传统谷物食醋醋酸发酵阶段的翻醅、倒缸^[3]；大曲制作过程中的曲房通风、调换位置^[4]；酱香型白酒的酒醅堆积等^[5]。这种干预客观上调控了微生物群落结构与功能，在一定程度上保证了酿造食品品质和批次的稳定性，深刻体现了中国人一贯秉承的“道法自然、天人合一”的哲学理念。

传统酿造通常采用固态或半固态、开放或半开放的发酵体系，甚至部分原料直接使用生料，不经过灭菌处理^[3,6]。来源复杂且多样的微生物以酿造原料为基质进行代谢和选择性增殖，形成剧烈的微生物群落结构演替，从而推动发酵的进程。虽然在同一个生产批次中，群落结构、基质营养以及产物生成等发生着剧烈变化，但是传统酿造的不同批次之间，微生物群落和产品品质高度可重复，充分体现了这种剧烈变化的生态系统具有显著的鲁棒性^[4,7-9]。这一特征为剖析微生物群落演替及其功能关系奠定了基础^[10,11]。

在现代科学，尤其是生物技术高度发达的今天，对传统酿造工艺的科学阐释是理解先人“天人合一”哲学思想的重要途径，是现代人对传统技艺传承和扬弃的重要依据。传统酿造具有食品原料复杂、参与酿造过程的微生物多、代谢反应多、工艺繁复等特点，使得科学阐释传统酿造过程存在巨大的挑战^[12]。基因组学和转录组学等生物信息分析技术的发展和应用于研究发酵过程中微生物群落结构与功能、微生物群落内部及其与环境的交互等提供了有力的支撑，使得科学描述和解释传统发酵食品的酿造技艺成为可能^[1,13-15]。

传统酿造食品的发展既要坚持传承，也需持续创新以适应现代社会对于食品营养、卫生与安全等品质的要求。从依赖经验技艺的生产方法过渡到高效可控的现代生产模式，实现传统发酵食品生态系统的微生物功能可控、生产过程可控和产品品质可控是传统酿造食品行业面临的重大课题。本文在对我国传统酿造食品的微生态研究归纳的基础上，总结了我国传统发酵食品的微生态系统的特殊性，并结合本研究团队前

期工作，阐述从系统解析酿造微生物群落结构与代谢功能入手，探究微生物群落及个体功能并实现理性调控的研究策略，为科学解析我国优势传统酿造食品技艺，实现产业转型升级提供强大的理论和实践支撑。

1 中国传统食品酿造微生态的环境特点

中国传统酿造食品种类繁多，各类型的发酵过程中形成的微生态各不相同，但它们的酿造环境仍存在一些共同的特点。

1.1 严酷的环境条件驱动微生物群落的自我净化

中国传统发酵食品根据发酵原料可以分为以下几类：以谷物类为原料的白酒、食醋、酱油、酱、腐乳等；以肉类为原料的腊肠、火腿、鱼酱等；以乳制品为原料的干酪；以蔬果类为原料的泡菜等。酿造前期，在微生物产生的纤维素酶和蛋白酶等的作用下，原料中的可发酵糖以及氨基酸得到释放，供微生物大量生长和代谢利用；随着酿造进程的推进，体系中营养物质被大量消耗，而酸、醇等对微生物存在抑制性的代谢产物急剧积累，造成对微生物的营养限制和产物抑制作用。同时人为的干预手段，如食醋酿造过程中的翻醅、曲房的控温、酱油酿造过程中添加盐等，也都起到了对微生态的干预作用。上述的内源的以及人为的双重因素，导致酿造过程中物种丰富度和多样性呈现出明显的时间差异。

本研究团队在前期对镇江香醋的微生物演替规律分析中发现，发酵初期高乙醇及后期低pH的环境对醋醅中的微生物群落结构有显著影响，形成传统酿造过程的“微生物群落自我净化”的机制(self-domestication)，这是保持传统酿造工艺批次稳定性的重要前提之一^[16]。其他学者分析了山西老陈醋和天津独流醋的醋酸发酵过程，也得出了类似的结论^[17-20]。再如白酒酿造过程中，酒醅中的高乙醇和大曲发酵中的高温，酱油酿造过程中的高盐等极端环境条件对微生物群落的演替具有很强的选择性。经过长期的极端生产环境适应性驯化，这些在酿造后期仍保持较好的繁殖速率和代谢活性的微生物也随之不断进化，形成了良好的耐受性并发挥着重要的酿造功能。因此，中国传统酿造食品独特的工艺选择所形成的极端酿造小生境是微生物群落自净化的主要成因，也是传统酿造食品批次

稳定性和产品品质的重要保障。

1.2 固态发酵方式决定微生态环境具有较大的空间差异性

中国传统发酵食品大多数采用固态发酵方式, 如白酒、食醋、酱油、酱、腐乳等。固态发酵区别于液态发酵的典型特点是发酵体系的不均一性, 即在营养和环境两方面都存在显著的空间差异。例如, 在食醋醋酸发酵阶段, 醋醅表层和底层的氧气含量、温度都存在较大的差异^[19]。在制曲过程中, 曲块内部和表层具有显著差异的微生物群落结构^[21]。部分类型白酒的发酵过程中, 相较于中间位置, 靠近窖池四壁、顶层和底层的酒醅更多地接触窖泥, 存在更为显著的物质和微生物交流^[22]。

除宏观的空间差异外, 在微观尺度固态发酵体系也存在显著的不均一性。发酵体系中的固形物一方面为微生物提供了可物理附着的支撑物, 同时也造成了环境和营养条件的相对隔离, 进而为不同微生物提供了相对独特的栖息地(habitat), 这种在相对隔离的特定微环境中形成的特定微生物亚群称为一个生态位(ecological niches)^[10,23], 而这些微生物亚群的代谢行为又对所在栖息地的环境进行着持续的反馈影响。例如, 在食醋发酵过程中, 醋醅中的麸皮和稻壳形成的间隙使得积累的醋酸渗透到底部, 不过多接触上层空间的微生物, 某种程度上保证了酿造后期在醋醅中仍能保持较丰富的物种, 并行使其发酵能力, 从而促进产品多样性风味的形成与积累。因此, 酿造食品的微生物生态系统中, 各不相同的生态位共同组成固态发酵体系, 是中国传统发酵食品物质种类丰富、风味浓郁的一个重要原因^[24-29]。

2 中国传统酿造食品的微生物生态学研究策略

中国传统发酵食品中的微生态系统具有高度的复杂性: 微生物来源丰富、结构多样、参与的代谢反应众多。对于这样一个复杂体系, 只有在遵循微生物内部及其与环境复杂的交互作用机制的基础上, 解析微生物群落结构、明确其代谢功能, 在错综复杂的微生物交互作用网络中锚定核心功能微生物, 才能实现有效地调控代谢功能^[30]。

随着组学技术的兴起与快速发展, 国内外学者对传统酿造食品微生物生态学进行了大量的研究。近10年来, 本研究团队发展并丰富了从系统解析酿造微生物群落结构与代谢功能入手, 阐明微生物群落及个体功能并实现理性调控的传统酿造微生物群落研究策略。抓住微生物群落三个核心要素: 结构、功能、调控; 解析好两个互动: 酿造群落内的交互作用、群落与外部环境的交互作用; 抓住一个关键: 群落中的关键核心功能微生物(群)。在上述基础上努力实现传统食品酿造过程中的三个可控: 微生物功能可控、酿造过程可控、产品品质可控(图1)。

2.1 剖析传统发酵食品微生物群落的构成

各种来源的微生物, 包括非灭菌的原料、曲、上一批次的接种物以及开放的工作环境, 造就了中国传统发酵食品微生物群落的多样性。目前研究发酵食品中群落结构的手段主要可分为依赖纯培养的方法和不依赖纯培养的方法^[10,15,31]。例如, 针对食醋的醋酸发酵阶段, Li等人^[32]总结了不同食醋在醋酸发酵过程中分离筛选得到的菌株, 其中醋酸菌(主要包括醋杆菌属、葡萄糖杆菌属和葡萄糖醋酸杆菌属)、乳酸菌(主要包括乳杆菌属和乳球菌属)和芽孢杆菌属是易被分离得到的微生物^[26,33]。不依赖培养的方法主要有PCR-变性梯度凝胶电泳(denatured gradient gel electrophoresis, DGGE)、基于16S rRNA基因(细菌或古菌)、18S rRNA基因和ITS序列(真菌)以及功能区域的扩增子测序(amplicon sequencing)、宏基因组学(megagenomics)和宏转录组学(megatranscriptomics)分析技术等, 表1分别介绍了各方法的研究范畴和优缺点。有研究应用扩增子测序和PCR-DGGE分析了镇江香醋、山西陈醋和天津独流醋的醋酸发酵阶段的微生态系统, 得到了微生物群落结构的信息^[16-19,34]。通过宏基因组测序揭示了镇江香醋醋醅中存在951属^[27]。Yang等人^[35]研究了酱油在超长发酵(4年)过程中的细菌和真菌的群落结构变化, 发现随着发酵时间的延长, 细菌和真菌的丰富度和多样性都在下降, 而均一度变化不大, 其中在整个发酵周期内, 相对丰度较高的属为芽孢杆菌、克雷白氏杆菌、*Shimwellia*属以及魏斯氏属。由于目前在测序技术和数据库仍然不够完善, 样品扩增中也存在偏好性的问题, 加之不同微生物扩增子拷贝数也不相同, 会造成高通量分析结果存在一定程度的失真, 物种的多

样性也可能被低估。因此需要结合实际样品情况对结果进行合理性判别, 尽量避免信息失真。随着GenBank和KEGG(Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes)等参考数据库的更新, 基于高通量测序技术的微生物

图 1 中国传统酿造食品微生态研究的基本策略
Figure 1 Approaches for investigating the microbial ecology of traditional Chinese fermented foods

表 1 微生物群落结构与功能分子生态学研究的主要策略
Table 1 Molecular ecological approaches for microbial community structure and function analysis

研究策略	基本原理	优势	局限性
PCR-变性梯度凝胶电泳 (DGGE)	根据DNA在不同浓度的变性剂中解链行为的不同而导致电泳迁移率发生变化, 将片段大小相同但碱基组成不同的DNA片段分开	操作简单, 可快速获得图谱; 结果直观, 可重复性高; 灵敏度高, 理论上可以检测出一个碱基差异的DNA片段	难以检测低丰度微生物; 有效检测的片段长度约为200~700 bp; 某些物种拷贝之间异质性和多态性导致物种多样性错误估计; 物种16S rRNA基因拷贝数、仪器检测限及不同序列DNA的共迁移均影响物种丰富度的判断
扩增子测序 (Amplicon sequencing)	用于分析特定基因组区域中的基因变异。利用PCR扩增靶向地捕获目标区域, 对PCR产物进行测序, 解析样本中微生物的物种谱, 包括16S rRNA基因(细菌或古菌)、18S rRNA基因和ITS序列(真菌)以及功能区域测序等	通量高, 成本低; 可根据研究目的选择不同的靶向扩增区域, 避免非靶向测序造成的数据冗余	目标测序区域的选择引起结果差异; 物种16S rRNA基因拷贝数不同造成的丰富度计算误差; PCR扩增偏好性的干扰
宏基因组学 (Megagenomics)	研究对象是特定生境中全部微生物的基因组信息。通过直接提取样本总DNA, 构建基因组文库, 利用基因组学的研究策略, 解析特定生境所包含的全部微生物的遗传组成及其功能和代谢途径	通量高, 微生物物种信息更为全面; 避免了PCR扩增引起的误差	若测序深度低, 低丰度的物种可能会无法组装, 增加深度, 成本也将显著提高; 分析结果受DNA提取以及测序和数据组装分析方法的影响; 相较于扩增子测序, 其计算资源消耗大, 时间花费长
宏转录组学 (Megatranscriptomics)	研究对象是特定生境、特定时空下全部微生物的基因组转录情况以及转录调控规律。直接提取样本总RNA, 构建转录组文库, 原位解析微生物群落中活跃的微生物以及活性基因的表达, 比较不同环境下基因和途径的差异表达, 探索环境与微生物之间的互作机理	通量高, 微生物物种信息更为全面; 提供原位条件下活性功能基因的实时表达情况	对于复杂环境样本, 提取高质量RNA是该技术应用的壁垒; RNA提取方法、测序深度和数据组装分析方法都会影响结果; 原核微生物中rRNA占比高, 测序通量较低时, 只能检测到少量的mRNA

群落结构与功能解析将会更加可靠准确^[36].

2.2 解析微生物群落的代谢功能

中国传统酿造食品中微生物物种的高度多样性使得进一步了解微生物群落的代谢功能是一个更大的挑战. 针对这种复杂生态系统中微生物群落代谢行为的研究, 需要架构起微生物群落和代谢物之间的交互桥梁^[30]. 首先可以从功能基因入手, 解析不同微生物之间的代谢物交换机制, 明确针对整体的发酵任务, 群落中各微生物所参与的代谢反应通路; 在此基础上, 绘制整体群落代谢途径的交互网络; 最终抽提出位于关键代谢网络节点的核心功能微生物. 这种连接整体和局部、表型和基因型的研究方法是剖析传统发酵食品微生物网络及核心功能微生物的有效策略.

本研究团队前期利用双向正交偏最小二乘法(Bi-directional Orthogonal Partial Least Squares, O2PLS)对基因组和代谢物进行了相关性分析, 并且对镇江香醋的醋酸发酵阶段微生物群落演替和风味物质动态变化的数据矩阵也进行了相关性研究, 最终构建了食醋酿造微生物组的基因型与表型之间的关系网络, 预测了包括醋酸杆菌、乳杆菌属、水栖菌属、乳球菌属、葡糖醋杆菌属、芽孢杆菌属和葡萄球菌在内的7个属为产生食醋风味的关键少数功能微生物^[19]. 这种统计学分析方法为关联传统发酵食品微生物生态系统的表型和基因型提供了一个可行的策略.

解析传统发酵食品生态系统中微生物代谢作用的另一个挑战是微生物代谢网络的重构^[37]. 已有研究通过宏基因组分析阐明了镇江香醋微生物群中的风味代谢网络, 分析了来源于35个门、951个属的8.6万条蛋白编码基因参与谷物醋醋酸发酵阶段的代谢功能, 揭示了微生物在不同代谢途径中的分布差异^[27]. 通过这种方法, 发现有机酸代谢以外的另外两个重要的功能微生物群——乙偶姻-双乙酰-丁二醇群组和3-甲基丁醇-3-甲基丁酸-缬氨酸-亮氨酸群组, 表明食醋酿造生态系统中微生物功能的协同互补.

2.3 关注复杂的微生物群落内部及其与环境之间的互作关系

微生物之间的交互作用是普遍而广泛存在的, 并且是决定群落结构和功能的内在因素之一^[38]. 在混合菌种发酵食品的研究中, 西方关于酸奶、开菲尔(Ke-

fir)以及酸面包(sour dough)发酵过程中微生物之间的交互作用机制以及它们各自对发酵过程的贡献研究得较透彻^[10,39]. 然而, 中国传统发酵食品开放程度高、微生物构成复杂, 发酵过程绝对不仅仅是单个微生物的叠加, 存在复杂的交互作用机制, 包括细胞与细胞之间的物理接触、代谢物交换、水平基因转移等方式, 这些多种多样的作用方式最终形成了微生物之间的共生、竞争、偏利共生、偏害共生以及寄生等交互作用关系, 进而也影响了群落整体的组成结构以及功能^[40,41].

目前关于中国传统酿造食品中微生物交互作用的研究大多采用纯培养结合共培养的方式. 例如, Meng等人^[42]针对酱香型白酒的体系, 对酿酒酵母和地衣芽孢杆菌进行了纯培养和共培养的对比, 分析了风味化合物与两株微生物共培养的相关性, 然而在复杂菌群背景下分析交互作用网络仍是一个极大的挑战. Lu等人^[3]利用宏基因组和克隆文库的分析方法, 解析了醋醅微生物群落共同完成乙偶姻和双乙酰代谢的途径, 在种水平上预测了参与各步反应的主要微生物种类, 从代谢物交流的角度分析了该代谢途径中微生物的交互作用模式. 但是, 更多的传统发酵食品中微生物互作关系仍有待研究确定. 这一研究的不足客观上阻碍了对传统酿造工艺机理的深入了解, 同时限制了对酿造核心微生物的理性利用, 增加了传统酿造过程改造与产品品质提升的不确定性^[41]. 采用多组学的分析手段^[38,43], 通过功能基因或蛋白预测研究菌群中微生物之间的代谢途径互补关系, 构建微生物水平的代谢关系网络是研究传统酿造食品微生物群落交互作用关系的有效切入点; 而这种互补的代谢关系最终需要通过微生物纯培养、组合培养以及原位培养等实验手段加以验证.

除微生物群落内部的互作以外, 微生物与环境之间也有复杂的交互作用关系. 随着发酵过程的推进, 酿造微生态环境也不断改变, 进而又作用于微生物群落, 影响着群落的结构和功能, 并最终影响产品品质^[38]. 如中温大曲的发酵温度可以达到55℃以上, 这种微生物自发产生的内源性生物热从第4天开始显著抑制了大多数微生物的生长, 然而一些耐热的微生物, 如芽孢杆菌、魏斯氏菌属、高温放线菌属、嗜热子囊菌属以及嗜热真菌属可以存活并保持代谢活性, 该研究同时证实了生物热是推动中温大曲微生物群落自我

净化、功能菌群形成的主要驱动力^[4]。这些推动菌群净化与演替的环境条件, 包括酒醪中的高酒精含量(9%)、醋醅中的高酸度(pH 3.0)以及生物热(~45℃)等, 均由微生物代谢活动产生的, 同时也对微生物施加选择压力。微生物与环境的紧密交互作用有助于在生产中保障批次之间可重复的微生物群落结构、动态演替和稳定的风味形成^[44,45]。因此, 系统理解传统酿造食品的发酵进程, 需要明晰环境与微生物之间的互作机制, 才能更好地理解传统工艺的科学性, 进而建立调控群落功能的有效策略。

2.4 调控微生物群落的酿造功能

中国传统酿造食品发酵产物成分错综复杂, 这也意味着肩负着发酵任务的微生物群落的任务复杂, 绝非单一的微生物或盲目选择的几种微生物能够替代完成的^[40]。因此, 调控微生物群落的酿造功能必须了解参与各种生化反应的微生物, 通过代谢网络模块化处理将发酵任务分解, 确定关键微生物的各个单元任务, 并通过调节发酵参数和强化菌株功能来实现调节微生物群落的代谢功能的目标^[46]。

需要强调的是, 由于纯培养和生产环境的发酵条件差异显著, 将微生物纯培养物接种到复杂的微生物群中的效果通常不能达到预期效果^[47]。由于在食品发酵工业中, 通常不能使用《可用于食品的微生物名单》以外的菌种, 对外源野生型或转基因微生物引入发酵系统造成障碍。传统酿造微生态系统中的功能性微生物适应特殊生产环境, 具有较强的代谢功能, 并且不存在食品安全问题, 因此作为强化菌种具有良好的可行性和有效性^[48]。确定强化工艺, 包括核心功能微生物种类、微生物强化方式和频率, 多种功能微生物的组合和比例等重要参数需要进行大量的前期研究。

本研究团队以镇江香醋醋酸发酵过程为研究模型, 探索了生物强化的可行方式。例如, 在醋酸发酵开始时加入来源于醋醅的巴斯德醋酸菌, 可以增加镇江香醋中的风味物质^[19], 缩短醋酸发酵周期, 增强醋醅中总酸、2,3-丁二醇和川芎嗪的积累。另外, 探索了以提高乙偶姻积累量为目标的生物强化方法^[3]。首先通过宏基因组学, 揭示了酿醋微生物群中双乙酰/乙偶姻代谢途径的五种酶基因的物种水平多样性, 巴斯德醋酸菌和四种乳酸杆菌(布氏乳杆菌、罗伊氏乳杆菌、短乳杆菌和发酵乳杆菌)被推断为主要的乙酰乳酸合

成酶(acetolactate synthase, ALS)和乙酰乳酸脱羧酶(acetolactate decarboxylase, ALDC)的生产者, 完成了从2-乙酰乳酸合成乙偶姻的生物转化。在分离纯化得到这些微生物之后, 通过在醋醅中增加巴斯德醋酸菌G3-2、短乳杆菌4-22、发酵乳杆菌M10-3和布氏乳杆菌F2-5, 原位增强了酿醋微生物群落产乙偶姻的功能^[3]。在前期研究的基础上, 可以总结得到以下传统酿造食品生物强化的方法供读者探讨: 分析微生物群的组装和功能, 构建群落规模的代谢网络; 重点关注网络节点微生物, 确定其在群落中与其他微生物的互作关系; 在此基础上, 基于遗传信息预测得到的这些关键少数微生物的代谢特点, 理性设计纯培养条件, 培养关键少数的微生物; 通过原位和非原位的培养方法, 评估分离得到的菌株的代谢功能; 在实际酿造生产过程中, 进一步分析这些微生物在真实的微生态环境中的增殖效果, 协调各步反应参与微生物的代谢平衡, 制定合理的强化工艺。

3 总结与展望

我国传统酿造食品的发酵过程具有各自独特的微生态环境, 微生物群落进行着高度可重复的剧烈演替, 在先辈经验的传承下, 人类对这一生态环境进行着适度的调控, 推动发酵的进程, 保证了传统酿造食品独特的风味和品质。目前的研究在微生物群落结构、代谢功能方面提供了基础信息, 未来需要对这一复杂生态系统进一步深入解析, 以实现科学阐释传统酿造技艺的科学性, 为进一步推动产业提升奠定基础。

(1) 多组学信息的有效整合是阐明传统发酵食品复杂微生物群功能的有效切入点。例如, 将宏基因组学与其他组学相结合, 可以有效地填补各组学提供信息的缺口、连接和沟通各层面信息、多尺度解析微生物群落功能^[13,14,49]。

(2) 在核心微生物的功能验证以及生物强化的工作流程中, 培养功能性微生物是关键步骤。然而, 大多数自然界中的微生物(~99%)仍然很难培养^[47]。微生物培养组学(microbial culturomics)可以对难培养微生物的培养条件进行高通量比较^[50]。

(3) 自上而下和自下而上的研究并举。以宏组学为代表的自上而下(top-down)的研究策略可以从宏观把控群落信息, 更加快速有效地定位核心功能微生物, 避

免庞杂体系中的一叶障目^[1,15]. 从个体出发的自下而上(bottom-up)的组织形式和研究思路, 如单细胞拉曼光谱结合稳定同位素探测技术和拉曼激活细胞分选技术, 可以明确群落中的个体构成以及代谢特点^[51~53]. 需要将这两个研究策略的联合应用, 从而深入分析群落环境中微生物的代谢功能和生态作用.

(4) 基于预测模型管理微生物群的代谢功能. 传统的生产过程中, 通过分析物理化学参数来评估发酵过程的进展, 对批次的生产效果进行预判. 然而对这些高度复杂、动态变化的群落的功能的预测和调控能力有限, 因此, 使用数学模型和建立预测模型是未来研究

中国传统发酵食品的重要发展方向, 是产品品质保障和进一步提升的重要支撑^[54~56].

(5) 人工功能核心微生物群落的构建. 传统发酵食品微生物群落中的关键少数微生物对于推进发酵的进程有决定性作用. 因此, 如果可以在足够的理论参考信息基础上, 设计并合成减量的微生物群体将具有划时代意义. 合成群落可以用于开发在密闭环境中(如发酵罐)用灭菌的原料进行发酵食品生产的现代化工艺路线; 同时也可以应用于构建副反应功能减弱的酿造微生物群, 以提高底物利用率、减少发酵时间并保持发酵产品的质量^[57,58].

参考文献

- Chen G, Chen C, Lei Z. Meta-omics insights in the microbial community profiling and functional characterization of fermented foods. *Trends Food Sci Tech*, 2017, 65: 23–31
- McGovern P E, Zhang J, Tang J, et al. Fermented beverages of pre- and proto-historic China. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, 101: 17593–17598
- Lu Z M, Liu N, Wang L J, et al. Elucidating and regulating the acetoin production role of microbial functional groups in multispecies acetic acid fermentation. *Appl Environ Microbiol*, 2016, 82: 5860–5868
- Xiao C, Lu Z M, Zhang X J, et al. Bio-heat Is a key environmental driver shaping the microbial community of medium-temperature Daqu. *Appl Environ Microbiol*, 2017, 83
- Zhang R, Wu Q, Xu Y. Aroma characteristics of Moutai-flavour liquor produced with *Bacillus licheniformis* by solid-state fermentation. *Lett Appl Microbiol*, 2013, 57: 11–18
- Ren C, Du H, Xu Y. Advances in microbiome study of traditional Chinese fermented foods (in Chinese). *Acta Microbiol Sin*, 2017, 57: 885–898 [任聪, 杜海, 徐岩. 中国传统发酵食品微生物组研究进展. *微生物学报*, 2017, 57: 885–898]
- Wang Z M, Lu Z M, Yu Y J, et al. Batch-to-batch uniformity of bacterial community succession and flavor formation in the fermentation of Zhenjiang aromatic vinegar. *Food Microbiol*, 2015, 50: 64–69
- Wei Q, Wang H, Chen Z, et al. Profiling of dynamic changes in the microbial community during the soy sauce fermentation process. *Appl Microbiol Biotech*, 2013, 97: 9111–9119
- Li P, Lin W, Liu X, et al. Effect of bioaugmented inoculation on microbiota dynamics during solid-state fermentation of Daqu starter using autochthonous of *Bacillus*, *Pediococcus*, *Wickerhamomyces* and *Saccharomycopsis*. *Food Microbiol*, 2017, 61: 83–92
- Wolfe B E, Button J E, Santarelli M, et al. Cheese rind communities provide tractable systems for *in situ* and *in vitro* studies of microbial diversity. *Cell*, 2014, 158: 422–433
- Wolfe B E, Dutton R J. Fermented foods as experimentally tractable microbial ecosystems. *Cell*, 2015, 161: 49–55
- Zhang J, Chen J. Current status and research progress of traditional Chinese fermented food industry (in Chinese). *Biotech Business*, 2015, 4: 11–16 [张娟, 陈坚. 中国传统发酵食品产业现状与研究进展. *生物产业技术*, 2015, 4: 11–16]
- Kim S, Kim J, Yun E J, et al. Food metabolomics: From farm to human. *Curr Opin Biotech*, 2016, 37: 16–23
- Heintz-Buschart A, May P, Lacznay C C, et al. Integrated multi-omics of the human gut microbiome in a case study of familial type 1 diabetes. *Nat Microbiol*, 2017, 2: 16180
- De Filippis F, Parente E, Ercolini D. Metagenomics insights into food fermentations. *Microb Biotech*, 2017, 10: 91–102
- Xu W, Huang Z, Zhang X, et al. Monitoring the microbial community during solid-state acetic acid fermentation of Zhenjiang aromatic vinegar. *Food Microbiol*, 2011, 28: 1175–1181
- Li S, Li P, Liu X, et al. Bacterial dynamics and metabolite changes in solid-state acetic acid fermentation of Shanxi aged vinegar. *Appl Microbiol Biotech*, 2016, 100: 4395–4411

- 18 Nie Z, Zheng Y, Wang M, et al. Exploring microbial succession and diversity during solid-state fermentation of Tianjin duliu mature vinegar. [Bioresour Tech](#), 2013, 148: 325–333
- 19 Wang Z M, Lu Z M, Shi J S, et al. Exploring flavour-producing core microbiota in multispecies solid-state fermentation of traditional Chinese vinegar. [Sci Rep](#), 2016, 6: 26818
- 20 Xu W, Zhang X, Xu H, et al. Analysis of bacterial communities in aerobic solid-fermentation culture of Zhenjiang Hengshun vinegar (in Chinese). *Microbiol China*, 2007, 34: 646–649 [许伟, 张晓君, 许泓瑜, 等. 镇江香醋醋酸发酵过程中细菌群落组成分析. *微生物学通报*, 2007, 34: 646–649]
- 21 Zhao J S, Chen Z J, Wu C D, et al. Difference in microbial community structure and volatile compounds between surface and core of nong-flavor Daqu (in Chinese). *Liquor-Making Sci Technol*, 2013, 12: 9–12 [赵金松, 陈泽军, 吴重德, 等. 浓香型大曲曲块部位间微生物群落结构与风味组分差异的研究. *酿酒科技*, 2013, 12: 9–12]
- 22 Qiao Z W, Zhang W X, Zhang L Y, et al. Analysis on microbes in brewing mass of strong aromatic spirits during fermentation (in Chinese). *Liquor Making*, 2005, 1: 18–22 [乔宗伟, 张文学, 张丽莺, 等. 浓香型白酒发酵过程中酒醅的微生物区系分析. *酿酒*, 2005, 1: 18–22]
- 23 Gifford S M, Sharma S, Booth M, et al. Expression patterns reveal niche diversification in a marine microbial assemblage. [ISME J](#), 2013, 7: 281–298
- 24 Zhao J S, Zheng J, Zhou R Q, et al. Microbial community structure of pit mud in a Chinese strong aromatic liquor fermentation pit. [J Inst Brew](#), 2012, 118: 356–360
- 25 Peng Q, Yang Y, Guo Y, et al. Analysis of bacterial diversity during acetic acid fermentation of Tianjin Duliu aged vinegar by 454 pyrosequencing. [Curr Microbiol](#), 2015, 71: 195–203
- 26 Wu J J, Gullo M, Chen F S, et al. Diversity of acetobacter pasteurianus strains isolated from solid-state fermentation of cereal vinegars. [Curr Microbiol](#), 2010, 60: 280–286
- 27 Wu L H, Lu Z M, Zhang X J, et al. Metagenomics reveals flavour metabolic network of cereal vinegar microbiota. [Food Microbiol](#), 2017, 62: 23–31
- 28 Chai L J, Xu P X, Qian W, et al. Profiling the Clostridia with butyrate-producing potential in the mud of Chinese liquor fermentation cellar. [Int J Food Microbiol](#), 2019, 297: 41–50
- 29 Zhou Z, Liu S, Kong X, et al. Elucidation of the aroma compositions of Zhenjiang aromatic vinegar using comprehensive two dimensional gas chromatography coupled to time-of-flight mass spectrometry and gas chromatography-olfactometry. [J Chromatogr A](#), 2017, 1487: 218–226
- 30 Lu Z M, Wang Z M, Zhang X J, et al. Microbial ecology of cereal vinegar fermentation: insights for driving the ecosystem function. [Curr Opin Biotech](#), 2018, 49: 88–93
- 31 Wu J J, Ma Y K, Zhang F F, et al. Culture-dependent and culture-independent analysis of lactic acid bacteria from Shanxi aged vinegar. [Ann Microbiol](#), 2012, 62: 1825–1830
- 32 Li S, Li P, Feng F, et al. Microbial diversity and their roles in the vinegar fermentation process. [Appl Microbiol Biotechnol](#), 2015, 99: 4997–5024
- 33 Wu J J, Ma Y K, Zhang F F, et al. Biodiversity of yeasts, lactic acid bacteria and acetic acid bacteria in the fermentation of “Shanxi aged vinegar”, a traditional Chinese vinegar. [Food Microbiol](#), 2012, 30: 289–297
- 34 Nie Z, Zheng Y, Du H, et al. Dynamics and diversity of microbial community succession in traditional fermentation of Shanxi aged vinegar. [Food Microbiol](#), 2015, 47: 62–68
- 35 Yang Y, Deng Y, Jin Y, et al. Dynamics of microbial community during the extremely long-term fermentation process of a traditional soy sauce. [J Sci Food Agric](#), 2017, 97: 3220–3227
- 36 Alivisatos A P, Blaser M J, Brodie E L, et al. A unified initiative to harness Earth’s microbiomes. [Science](#), 2015, 350: 507–508
- 37 Hanson N W, Konwar K M, Hawley A K, et al. Metabolic pathways for the whole community. [BMC Genom](#), 2014, 15: 619
- 38 Layeghifard M, Hwang D M, Guttman D S. Disentangling interactions in the microbiome: A network perspective. [Trends Microbiol](#), 2017, 25: 217–228
- 39 Sieuwerts S, de Bok F A M, Hugenholtz J, et al. Unraveling microbial interactions in food fermentations: From classical to genomics approaches. [Appl Environ Microbiol](#), 2008, 74: 4997–5007
- 40 Smid E J, Lacroix C. Microbe-microbe interactions in mixed culture food fermentations. [Curr Opin Biotech](#), 2013, 24: 148–154
- 41 Ghosh S, Chowdhury R, Bhattacharya P. Mixed consortia in bioprocesses: Role of microbial interactions. [Appl Microbiol Biotechnol](#), 2016, 100: 4283–4295

- 42 Meng X, Wu Q, Wang L, et al. Improving flavor metabolism of *Saccharomyces cerevisiae* by mixed culture with *Bacillus licheniformis* for Chinese Maotai-flavor liquor making. *J Ind Microbiol Biotech*, 2015, 42: 1601–1608
- 43 Shaw G T W, Pao Y Y, Wang D. MetaMIS: A metagenomic microbial interaction simulator based on microbial community profiles. *BMC Bioinf*, 2016, 17: 488
- 44 Shao M K, Wang H Y, Xu Y, et al. Yeast community structure and its impact on flavor components during the fermentation process of Chinese Maotai-flavor liquor (in Chinese). *Microbiol China*, 2014, 41: 2466–2473 [邵明凯, 王海燕, 徐岩, 等. 酱香型白酒发酵中酵母群落结构及其对风味组分的影响. *微生物学通报*, 2014, 41: 2466–2473]
- 45 Hu X, Du H, Ren C, et al. Illuminating anaerobic microbial community and cooccurrence patterns across a quality gradient in chinese liquor fermentation pit muds. *Appl Environ Microbiol*, 2016, 82: 2506–2515
- 46 Lindemann S R, Bernstein H C, Song H S, et al. Engineering microbial consortia for controllable outputs. *ISME J*, 2016, 10: 2077–2084
- 47 Oberhardt M A, Zarecki R, Gronow S, et al. Harnessing the landscape of microbial culture media to predict new organism-media pairings. *Nat Commun*, 2015, 6: 8493
- 48 Hays S G, Patrick W G, Ziesack M, et al. Better together: Engineering and application of microbial symbioses. *Curr Opin Biotech*, 2015, 36: 40–49
- 49 Yugi K, Kubota H, Hatano A, et al. Trans-omics: How to reconstruct biochemical networks across multiple “Omic” layers. *Trends Biotech*, 2016, 34: 276–290
- 50 Lagier J C, Khelaifa S, Alou M T, et al. Culture of previously uncultured members of the human gut microbiota by culturomics. *Nat Microbiol*, 2016, 1: 16203
- 51 Huang W E, Song Y, Xu J. Single cell biotechnology to shed a light on biological “dark matter” in nature. *Microbial Biotech*, 2015, 8: 15–16
- 52 Wang Y, Song Y, Tao Y, et al. Reverse and multiple stable isotope probing to study bacterial metabolism and interactions at the single cell level. *Anal Chem*, 2016, 88: 9443–9450
- 53 Wang Y, Huang W E, Cui L, et al. Single cell stable isotope probing in microbiology using Raman microspectroscopy. *Curr Opin Biotech*, 2016, 41: 34–42
- 54 Song H S, Cannon W, Beliaev A, et al. Mathematical modeling of microbial community dynamics: A methodological review. *Processes*, 2014, 2: 711–752
- 55 Widder S, Allen R J, Pfeiffer T, et al. Challenges in microbial ecology: Building predictive understanding of community function and dynamics. *ISME J*, 2016, 10: 2557–2568
- 56 Friedman J, Higgins L M, Gore J. Community structure follows simple assembly rules in microbial microcosms. *Nat Ecol Evol*, 2017, 1: 0109
- 57 Brenner K, You L, Arnold F H. Engineering microbial consortia: A new frontier in synthetic biology. *Trends Biotech*, 2008, 26: 483–489
- 58 Brugiroux S, Beutler M, Pfann C, et al. Genome-guided design of a defined mouse microbiota that confers colonization resistance against *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium*. *Nat Microbiol*, 2017, 2: 16215

Research strategies for microbial ecology of traditional chinese fermented foods

ZHANG XiaoJuan^{1,2}, LU ZhenMing^{1,2}, CHAI LiJuan², SHI JinSong³ & XU ZhengHong^{1,2}

1 Key Laboratory of Industrial Microbiology of Ministry of Education, School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China;

2 National Engineering Laboratory for Cereal Fermentation Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China;

3 School of Pharmaceutical Science, Jiangnan University, Wuxi 214122, China

The Chinese traditional fermented foods are commonly produced in an open and relatively harsh environment. The microbiota structure changed dramatically over time within the same batch of fermentation, and followed a highly repeated pattern among batches. Due to the extreme complexities of the fermentation process, including variety of nutritional condition, microorganism, components and metabolic reactions, it is quite challenging to explain the scientific principles of the fermentation processes. The development of genomics, transcriptomic, and modern instrumentation based metabolomics facilitate the investigation of the structure and the function of microbial communities, and enable disentangle microbial interactions within the community and the interaction between the microbial community and environment. In this review, based on the recent microbial ecology studies of traditional Chinese fermentation foods and our previous research in this field, we elaborated the strategies for investigating the microbial community structure and function. We proposed the approaches for elucidating the function of microbial community and individual microorganism. Follow three steps to deepen the understanding of the microbial community, which are investigation of the structure, the function and the regulation of the microbiota; resolve the two types of interactions, which exist within the microecological system, and also between the microbiota and external environment; focus on the key microorganism or the key community. In this way, traditional Chinese fermented foods might be produced in a modernized and more controllable producing process, featured with manageable microbiota function, accurate process monitoring, and controllable product quality.

traditional Chinese fermented foods, microbial ecology, microbial community, regulation of microbiota metabolism

doi: [10.1360/N052018-00255](https://doi.org/10.1360/N052018-00255)