

热风干燥大曲在贮存期细菌群落结构的变化

王洪¹, 罗惠波^{1,2}, 周平¹, 黄丹¹, 邓波^{3,4}, 沈才萍³, 邬捷峰³

(1. 四川理工学院生物工程学院, 四川自贡 643000) (2. 酿酒生物技术及应用四川省重点实验室, 四川自贡 643000) (3. 泸州老窖股份有限公司, 四川泸州 646000) (4. 国家固态酿造工程技术研究中心, 四川泸州 646000)

摘要: 本文通过高通量测序技术对热风干燥大曲在贮存期细菌群落结构进行研究, 旨在探究热风干燥对大曲在贮存期细菌群落结构的影响。研究发现, 热风干燥大曲随着贮存时间的增加细菌丰富度呈先增后减, 而细菌群落多样性随着贮存时间在增加。大曲中 *Firmicutes*(厚壁菌门)为绝对优势菌门, *Weissella*(魏斯氏菌属)为绝对优势菌属。热风干燥大曲于曲库贮存能促进 *Staphylococcus*(葡萄球菌属)细菌的生长, 而对 *Lactobacillus*(乳杆菌属)细菌的生长有一定的抑制作用, 于实验室贮存对 *Kroppenstedtia* 属和 *Bacillus*(芽孢杆菌属)细菌的生长有促进作用。随着贮存时间的增加, 实验室贮存能使热风干燥大曲的 *Paenibacillus*(类芽孢杆菌属), *Pseudogracilibacillus*(假纤细芽孢杆菌属), *Kroppenstedtia* 和 *Melghirimyces*(迈勒吉尔霉属)细菌的丰度进一步提升。随着大曲贮存时间的增加, 于曲库贮存的热风干燥大曲细菌数量趋于稳定。

关键词: 热风干燥大曲; 贮存期; 细菌群落结构; 相关性分析

文章编号: 1673-9078(2017)11-89-95

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2017.11.014

The Changes of Bacterial Community Structure of Hot Air Dried Daqu during the Storage

WANG Hong¹, LUO Hui-bo^{1,2}, ZHOU Ping¹, HUANG Dan¹, DENG Bo^{3,4}, SHEN Cai-ping³, WU Jie-feng³

(1. College of Bioengineering, Sichuan University of Science & Engineering, Zigong 643000, China) (2. Liquor Making Bio-Technology & Application of Key Laboratory of Sichuan Province, Zigong 643000, China) (3. Luzhou Laojiao Co., Ltd., Luzhou 646000, China) (4. National Engineering Research Center of Solid-state Brewing, Luzhou 646000, China)

Abstract: Bacterial community structure of hot air dried Daqu in the storage period was researched by high-throughput sequencing technology. The results showed that the bacterial abundance of hot air dried Daqu increased firstly and then reduced with increasing the storage time, while bacterial community diversity increased all the time. *Firmicutes* was the absolute dominant phyla, and *Weissella* was the absolute dominant genera. Hot air drying for Daqu stored in Daqu room could promote the growth of *Staphylococcus* bacteria, and inhibit the growth of *Lactobacillus* bacteria. Hot air drying for Daqu stored under laboratory conditions could promote the growth of *Kroppenstedtia* bacteria and *Bacillus* bacteria. With increasing the storage time, laboratory conditions could promote the abundance of *Paenibacillus*, *Pseudogracilibacillus*, *Kroppenstedtia*, *Melghirimyces* bacteria of hot air dried Daqu. The bacterial biomass of hot air dried Daqu stored in Daqu room tended to be stable with increasing the storage time

Key words: hot air drying Daqu; storage period; bacterial community structure; correlation analysis

中国白酒历史源远流长, 酒文化博大精深, 是世界六大蒸馏酒之一^[1]。它主要以高粱、玉米和大米等

收稿日期: 2017-06-11

基金项目: 固态酿造关键技术研究四川省院士(专家)工作站项目(GY2014-03); 酿酒生物技术及应用四川省重点实验室开放基金项目(NJ2014-01); 四川理工学院研究生创新基金项目(y2015010); 国家固态酿造工程技术研究中心项目(2015K-245); 四川省科技成果转化项目(2016CG0032)

作者简介: 王洪(1991-), 男, 硕士研究生, 研究方向: 酿酒生物技术及应用

通讯作者: 罗惠波(1969-), 男, 教授, 研究方向: 酿酒生物技术及应用

粮食为原料, 以大曲、小曲和麸曲等为糖化发酵剂, 经蒸煮、糖化、发酵、蒸馏、贮存、陈酿和勾兑而成的蒸馏酒。大曲主要以小麦、大麦和豌豆等为原料, 经粉碎拌水后压制成砖块状, 在开放式生产条件下自然网罗环境中的微生物进行接种, 经培菌、翻曲和存储等阶段后得到成品曲^[2]。大曲不仅是生产大曲酒的糖化发酵剂和生香剂, 同时也是酿酒原料的部分来源, 大曲中形成丰富的香气物质及其前体, 在白酒生产过程中直接或间接地进入酒体, 影响白酒的质量与风格^[3,4]。因此, 白酒的质量与大曲的质量有直接的关系, 没有高质量的大曲就酿不出高品质的酒, 所以酿酒行

业内有“曲乃酒之骨”、“有好酒必有好曲”的说法^[5]。然而,曲虫对大曲具有严重的危害性,能降低大曲的质量,造成重大的经济损失^[6]。通过对排潮降温期大曲进行热风干燥处理,不仅能够杀灭曲虫,还可以达到干燥目的,缩短大曲贮存时间^[7]。周平等^[8,9]探究了热风干燥技术对大曲质量的影响,发现经过干燥处理和未经过干燥处理的大曲质量差异不大,通过白酒酿造试验发现干燥处理大曲能在一定程度上提升白酒质量,提高出酒率。大曲通常要经过2~6个月的曲库贮存处理,使得大曲质量稳定后用于白酒生产。贮存后大曲中的微生物数量和结构也趋于稳定,而微生物对大曲酒的生产过程至关重要,通过对贮存期大曲微生物群落结构多样性分析,可以有效的指导白酒生产。

对大曲中微生物群落结构的研究很早就已开展,主要有培养法^[10]、磷脂脂肪酸法(PLFA)^[11]、16S rRNA 基因克隆文库法^[12]、PCR-DGGE 法^[13]和高通量测序技术^[14]等。其中,高通量测序技术通量大,产出数据多,能全面系统的揭示微生物群落结构和多样性^[15],是一种有效的研究方法。本试验通过高通量测序技术对经热风干燥处理的降温期大曲在贮存期细菌群落结构及多样性进行分析,旨在探究热风干燥对大曲在贮存期细菌群落结构的影响。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

排潮降温期大曲取自泸州老窖制曲生态园。

蛋白酶 K、溶菌酶、CTAB、SDS (美国 Sigma 公司); TaqDNA polymerase、dNTPs、DNA Marker (宝生物工程(大连)有限公司); 琼脂糖、丙烯酰胺和去离子甲酰胺等 (Solarbio); Quant-iT PicoGreen dsDNA Assay Kit; QIAquick Gel Extraction Kit, Quant-iTPicoGreen 定量试剂盒。

DYY-6C 型电泳仪 (北京六一仪器厂); 2720 型 PCR 扩增仪 (美国 ABI 公司); 凝胶成像分析系统 (美国 Bio-rad 公司); 实时荧光定量 PCR 仪 (ABI Step One Plus, 美国 Applied Biosystems 公司); Microplate reader (BioTek); 高速冷冻离心机 (美国 Thermo 公司); MX-S 型可调式混匀仪 (美国赛洛捷克); Illumina MiSeq 高通量测序平台 (美国 Illumina 公司); 实时荧光定量 PCR 仪 (ABI Step One Plus, 美国 Applied Biosystems 公司); Microplate reader (BioTek, FLx800)。

1.2 试验方法

1.2.1 试验材料预处理

对降温期大曲(培菌第 8 d)进行热风干燥处理(于干燥箱中,控制温度 50 °C、风速 1.2 m/s 干燥 72 h,使水分降到 15%左右),将干燥后的大曲分成两批,一批在实验室进行贮存(将大曲放入实验室保温盒中,上面盖上稻草,室温贮存),另一批返回泸州老窖曲库贮存。将热风干燥前的大曲(降温期大曲)批次标记为 RG1,将经过热风干燥后的大曲批次标记为 FK1,将降温期大曲在曲库进行自然干燥到和热风干燥同时间(72 h)的大曲批次标记为 ZR1(水分 21%);将大曲热风干燥后直接在实验室贮存 1 个月、2 个月的大曲批次分别标记为 RG2、RG3,将大曲热风干燥后返回曲库贮存 1 个月、2 个月的大曲批次分别标记为 FK2、FK3;将降温期大曲直接在曲库干燥后贮存 1 个月、2 个月的大曲批次分别标记为 ZR2、ZR3。每个批次的大曲随机选取 3 块进行粉碎,过 20 目筛混合后一部分贮于 4 °C 下用于理化指标的测定,另一部分贮于 -20 °C 下保藏用于微生物指标的测定。

1.2.2 大曲理化指标的测定

水分和水活度测定方法参考文献^[16];淀粉和酸度测定方法参考文献^[17]。

1.2.3 大曲基因组 DNA 的提取

取 5 g 大曲样品,加入 13.5 mL DNA 抽提液(100 mM/L Tris-HCl, 100 mM/L Na₂EDTA, 100 mM/L Na₃PO₄-NaH₂PO₄ 缓冲液, 1.5 M/L NaCl, CTAB 2%),溶菌酶(终浓度 10 mg/mL)、蛋白酶 K(终浓度 30 μg/mL)使其充分混匀。加入 1.5 mL 20% SDS 于 6000 r/min 离心 10 min 取上清液,再向沉淀中加入 4.5 mL 抽提液和 0.5 mL SDS 于 5000 r/min 离心 6 min 后上清液与先前上清液混合。向上清液中加入等体积酚-氯仿-异戊醇,12000 r/min 离心 20 min 后,向上清液加入 0.6 倍体积的异丙醇于 12000 r/min 离心 20 min 后弃上清液,向沉淀中加入 10 mL、70%乙醇于 12000 r/min 离心 20 min 弃上清液,用移液器吸去沉淀残余的乙醇,置于超净台吹风 30 min,除尽乙醇。通过 0.8%琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 提取质量,同时采用 Quant-i TPico Green 定量试剂盒检测 DNA 的浓度,置于 -20 °C 备用。

1.2.4 PCR 扩增

以大曲基因组 DNA 为模板,利用引物对 338F (5'-ACTCCTACGGGAGGCAG-3') 和 806R (5'-GGA CTACHVGGGTWTCT-3') 对细菌 16S rRNA 基因序列中的 V3-V4 可变区进行扩增。PCR 反应体系 (25 μL): Q5 DNA Polymerase 0.25 μL, 5×reaction buffer 5 μL, 5×GC buffer 5 μL, 2.5 mM dNTPs 2 μL,

Forward Primer(10 μM) 1 μL, Reverse Primer(10 μM) 1 μL, Template DNA 2 μL, ddH₂O 8.75 μL。PCR 反应条件: 98 °C 2 min; 98 °C 15 s, 55 °C 30 s, 72 °C 30 s, 29 个循环; 72 °C 5 min。PCR 扩增产物通过 2%琼脂糖凝胶电泳进行检测, 采用 QIAquick Gel Extraction Kit 对 PCR 扩增产物进行切胶回收。

1.2.5 高通量测序

制备好 DNA 文库样本后, 进行 emPCR 反应体系的制定^[18,19], 反应条件为: 94 °C、4 min; 94 °C、30 s, 58 °C、4.5 min, 68 °C、30 s, 50 个循环; 10 °C 保存。扩增完成后根据 emPCR 的结果将扩增子按要求稀释^[18], 然后将适当稀释后的扩增子上 Illumina MiSeq 测序平台进行测序。

1.2.6 荧光定量实时 PCR

参照电泳初步定量结果, 将 PCR 扩增回收产物进行荧光定量, 荧光试剂为 Quant-iT PicoGreen dsDNA Assay Kit, 定量仪器为 Microplate reader (BioTek, FLx800)。

1.2.7 数据分析

稀释曲线依靠 QIIME 软件绘制, 并利用 QIIME 软件计算出细菌群落的 Alpha 多样性指数, 包括 Chao1、ACE、Shannon 和 Simpson 指数, 16S rRNA 基因序列的比对分析采用 Silva 数据库, 理化数据使用 origin 作图, 多重比较采用 SPSS 软件 Duncan's 新复极差法进行比较, 使用 R 软件对大曲样品在属分类水平的微生物结构组成绘制柱状图, 并对丰度前 50 位的属进行聚类分析并绘制热图, 利用 R 软件进行 RDA 分析并作图。

2 结果与分析

2.1 大曲理化指标的变化

大曲理化指标是衡量大曲质量好坏的重要部分, 同时也影响着微生物的群落结构分布。理化指标变化情况如图 1 所示。

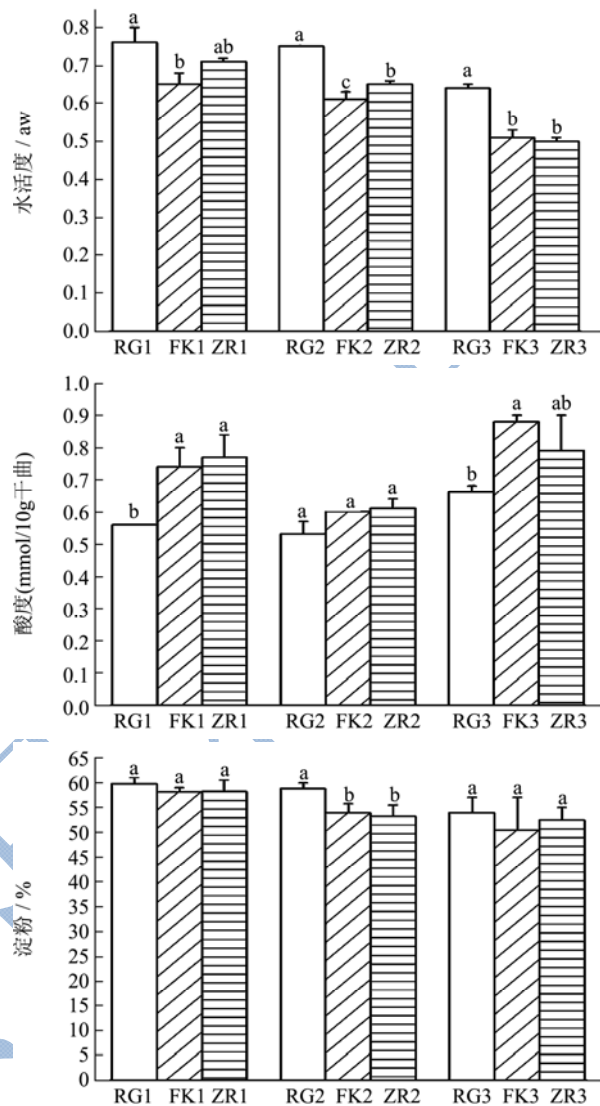
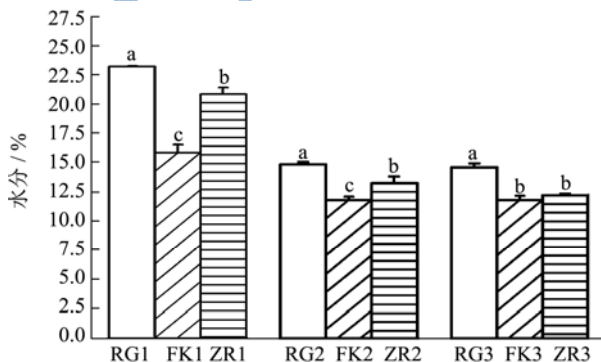


图 1 大曲理化指标的变化

Fig.1 The changes of physicochemical indexes of Daqu

注: 不同字母表示相同贮存时间不同处理方式下大曲理化指标差异显著 ($p < 0.05$)。

大曲水分含量和水活度与微生物生长代谢息息相关, 水分含量和水活度随着贮存时间的增加而不断的降低, 通过 2 个月贮存后最终含水量为 12%左右, 且 FK3 和 ZR3 无显著性差异 ($p > 0.05$), 满足出库大曲水分要求。酸度波动较大, 总体来说呈先降低后升高的趋势, 通过 2 个月的贮存, FK3 酸度要高于 ZR3。淀粉含量在贮存期缓慢降低, 且 RG3、FK3 和 ZR3 淀粉含量无显著性差异 ($p > 0.05$)。

2.2 OTU 丰度分析

通过对测序数据进行分析, 9 个样品共获得有效序列 636144 条, 平均长度 445 bp。使用 QIIME 软件, 调用 UCLUST 这一序列比对工具, 对前述获得的序列

按 97%的序列相似度进行归并和 OTU (Operational Taxonomic Units) 划分, 并选取每个 OTU 中丰度最高的序列作为该 OTU 的代表序列。其中样品 ZR3 的 OTU 数最多为 1040 个, 说明其群落丰富度最高 (图 2b)。样品 ZR1 的 OUT 数最少为 822 个, 说明群落丰富度相对较低, 其余七个样品 RG1、FK1、RG2、FK2、ZR2、RG3 和 FK3 的 OTU 数分别为 893、861、976、959、904、901 和 945。总体来看, 曲库自然干燥处理的大曲样品细菌丰富度随着贮存时间的增加而升高, 而其他 2 种处理方式的大曲 (即大曲经过热风干燥后分别于实验室贮存和返回曲库贮存的大曲) 样品随着贮存时间的增加, 细菌丰富度呈先增后减的趋势。从单个样品细菌丰富度来看, $RG1 > FK1 > ZR1$, 说明干燥过程会使细菌丰富度降低。

稀释曲线可以反映每个样本的当前测序深度是否足以反映该群落样本所包含的微生物多样性, 通过绘图可知 (图 2a) 9 个样品的稀释曲线随着随机抽取的序列总数的增加而趋于平稳, 表明测序结果已足够反映当前样本所包含的多样性, 继续增加测序深度已无法检测到大量的尚未发现的新 OUT, 说明取样合理。

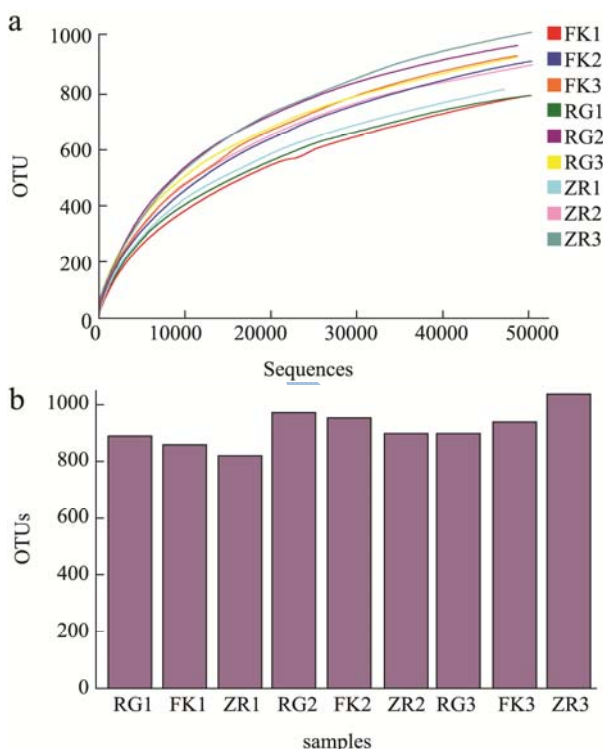


图 2 样品稀释曲线和 OTU 数

Fig.2 The rarefaction curves and OTUs of different samples

2.3 细菌群落多样性分析

对于微生物群落而言, 有多种指数可以反映其多样性。常用的指数主要包括侧重于体现群落丰富度的

Chao1 指数和 ACE 指数, 以及兼顾群落均匀度的 Shannon 指数和 Simpson 指数。一般而言, Chao1 或 ACE 指数越大, 表明群落的丰富度越高。Shannon 或 Simpson 指数值越大, 表明群落的多样性越高。通过计算得到大曲细菌 Alpha 多样性指数如表 1 所示。

表 1 大曲样品细菌 Alpha 多样性指数

Table 1 The bacterial Alpha diversity indexes of samples

samples	Alpha diversity index			
	Chao1	ACE	Simpson	Shannon
RG1	674	750.57	0.64	3.05
FK1	595	735.53	0.59	2.84
ZR1	549	677.00	0.64	3.29
RG2	724	820.98	0.73	3.98
FK2	682	843.59	0.71	3.51
ZR2	642	769.81	0.79	3.94
RG3	649	722.75	0.78	4.18
FK3	651	794.74	0.73	3.64
ZR3	748	895.28	0.76	3.92

由表 1 可知, 于曲库自然干燥处理大曲样品的 Chao1 指数和 ACE 指数值随着贮存时间的增加而增大, 而经过热风干燥处理后分别于实验室条件下和返回曲库贮存大曲样品的 Chao1 指数和 ACE 指数值随着贮存时间的增加呈先增后减的趋势, 与前述结果一致。相反的, 经过热风干燥处理后分别于实验室条件下和返回曲库贮存大曲样品的 Shannon 指数和 Simpson 指数值随着贮存时间的增加而增大, 说明其细菌群落多样性随着贮存时间在增加, 而于曲库自然干燥处理大曲样品的 Shannon 指数和 Simpson 指数值随着贮存时间的增加呈先增后减的趋势。

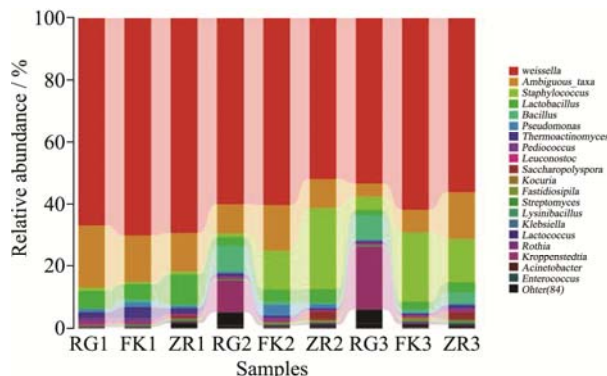


图 3 样品相对序列丰度较高的属分布图

Fig.3 The genus distribution diagram of relative higher sequences abundance of samples

大曲样品微生物主要分为四个门 (序列数超过 1%), 分别为 Firmicutes (厚壁菌门)、Cyanobacteria (蓝藻菌门)、Proteobacteria (变形菌门)、Actinobacteria (放线菌门), 序列数大小为 $Firmicutes > Cyanobacteria >$

Proteobacteria>*Actinobacteria*, 9 个样品 *Firmicutes* 序列数均超过 76%, 其中 *Firmicutes* 在样品 RG3 中占绝对优势菌门(序列数占 94%)。所有大曲样品中 *Weissella*(魏斯氏菌属)为绝对优势菌属(序列数均超过 50%), 并且随着贮存时间的增加有降低的趋势(图 3), 对于 *Staphylococcus*(葡萄球菌属), 在各个样品中相对序列大小为 RG3 (4.2%) >RG2>RG1 (1.1%), FK3 (22.3%) >FK2 (12.5%) >FK1 (0.8%), 说明大曲经过热风干燥后返回曲库贮存较实验室贮存更有利于促进 *Staphylococcus* 属细菌的生长, 且促进效果明显。在贮存期间大曲样品中 *Lactobacillus*(乳杆菌属)细菌有降低的趋势, 而样品 RG1、FK1 和 ZR1 的相对序列数分别为 5.53%、4.47%和 9.45%, 说明热风干燥对 *Lactobacillus* 属细菌的生长有一定影响。样品 RG2、RG3 中 *Kroppenstedtia* 属序列数较高, 分别为 9.85% 和 19.92%, 而其他样品均小于 0.3%, 由此可知, 大曲经热风干燥后于实验室贮存能显著性促进 *Kroppenstedtia* 属细菌的生长, 同时实验室贮存大曲中 *Bacillus*(芽孢杆菌属)序列数也较高 (8.42%, 7.98%)。

将属水平的群落组成数据根据分类单元的丰度分布进行聚类, 并通过热图加以呈现, 可以将高丰度和低丰度的菌属加以区分, 并以颜色梯度反映样品之间

的群落组成相似度, 并且根据样品间的相似程度加以聚类, 可将 9 个样品聚为四个大类(图 4)。样品 RG2 和 RG3 中 *Paenibacillus*(类芽孢杆菌属)、*Pseudogracilibacillus*(假纤细芽孢杆菌属)、*Kroppenstedtia*、*Melghirimyces*(迈勒吉尔霉菌属)、*Bacillus*(芽孢杆菌属)、*Virgibacillus*(枝芽孢杆菌属)、*Oceanobacillus*(海洋芽孢杆菌属)和 *Mechercharimyces* 属细菌丰度较高(图 4), 并且随着贮存时间的增加其中 *Paenibacillus*、*Pseudogracilibacillus*、*Kroppenstedtia* 和 *Melghirimyces* 属细菌丰度也随之升高, 说明该四个属细菌的多样性在不断增加。样品 ZR1 中 *Acetobacter*(醋酸杆菌属)、*Alkaliphilus*(嗜碱菌属)、*Enterobacter*(肠杆菌属)、*Lactobacillus*(乳杆菌属)、*Cronobacter*(阪崎肠杆菌)和 *Acinetobacter*(不动杆菌属)细菌丰度较高, 样品 FK2 中 *Pseudomonas*(假单胞菌属)、*Pelomonas* 属细菌丰度较高, 而 RG1 中 *Delftia*(代尔夫特菌属)和 *Leuconostoc*(明串珠菌属)丰度较高。*Lentibacillus* 属细菌种类在样品 ZR3 中更为丰富, *Thermoactinomyces*(高温放线菌属)细菌在 FK1 中更丰富, *Streptococcus*(链球菌属)和 *Brevibacterium*(短杆菌属)分别为 ZR2 和 FK3 最丰富的菌属。

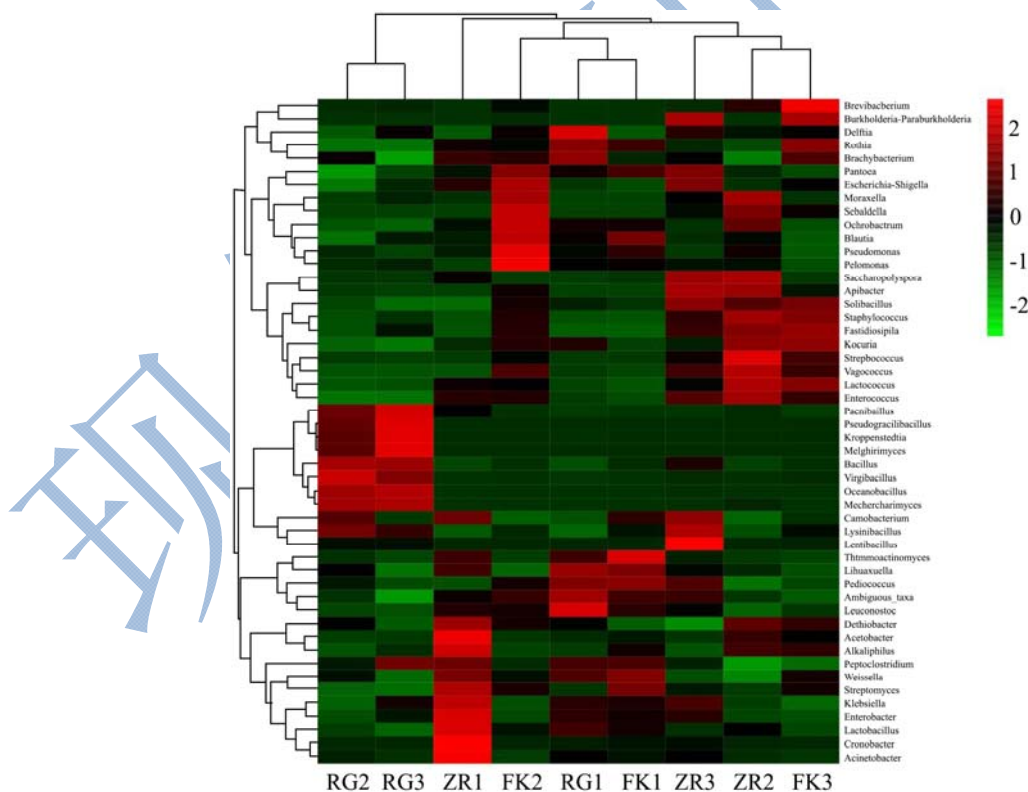


图 4 样品间细菌群落结构相似度热图

Fig.4 The heatmap of bacterial community structure similarity of samples

注: 大曲样品通过非加权组平均法(UPGMA)进行聚类。

2.4 大曲细菌群落多样性与理化指标的相关性分析

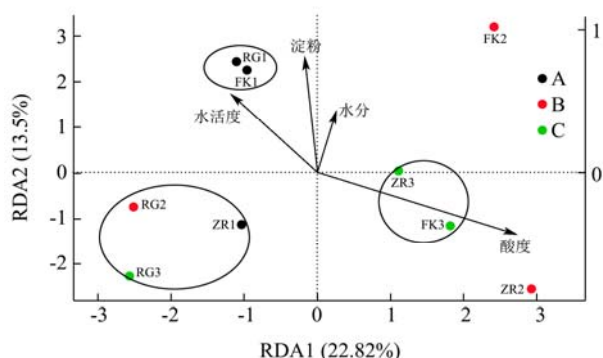


图5 样品细菌群落结构与理化指标的RDA分析

Fig.5 The analysis of RDA between bacterial community structures and physicochemical indexes of samples

环境因子通过改变微生物生长的条件而影响不同微生物的生长代谢，从而改变微生物群落结构和丰度。使用 R 软件对属水平的相对丰度矩阵进行 RDA 分析，通过分析可知（图 5），样品 RG1 和 FK1 的细菌群落结构相似度较高，ZR1、RG2 和 RG3 的细菌群落结构相似度较高，而 ZR3 和 FK3 相似度也较高；样品 RG1 和 FK1 的细菌群落结构受微环境中水活度、淀粉和水分影响较大，而酸度因子对 ZR3 和 FK3 的细菌群落结构影响较大。

2.5 大曲样品微生物量的变化

表2 样品中细菌 16S rRNA 基因的拷贝数

Table 2 The copy numbers of the bacterial 16S rRNA gene in samples

样品	细菌 16S rRNA 基因拷贝数/(g 样品)
RG1	8.171±0.103×10 ⁶
FK1	4.209±0.004×10 ⁶
ZR1	4.749±0.013×10 ⁶
RG2	5.609±0.274×10 ⁷
FK2	3.307±0.445×10 ⁷
ZR2	9.034±1.123×10 ⁷
RG3	1.188±0.553×10 ⁸
FK3	5.914±0.303×10 ⁷
ZR3	3.711±0.053×10 ⁷

大曲微生物结构和数量在贮存期间会发生变化，最终会趋于稳定。9 个样品通过荧光定量 PCR 得到细菌 16S rRNA 基因的拷贝数（表 2），总体来说，随着大曲贮存时间的增加，细菌的拷贝数呈先增后趋于平稳的趋势。其中 RG1<RG2，可知在实验室贮存条

件下细菌的数量还有一定增长的趋势，而曲库贮存已相对趋于稳定。

3 结论

3.1 热风干燥大曲随着贮存时间的增加细菌丰富度呈先增后减，而细菌群落多样性随着贮存时间在增加。大曲中 *Firmicutes*(厚壁菌门)为绝对优势菌门，*Weissella*(魏斯氏菌属)为绝对优势菌属，但该属相对序列丰度随着贮存时间的增加而降低。热风干燥大曲于曲库贮存能促进 *Staphylococcus*(葡萄球菌属)细菌的生长，而对 *Lactobacillus*(乳杆菌属)细菌的生长有一定的抑制作用，*Lactobacillus* 中的一些细菌能生成乳酸，为乳酸乙酯的合成提供前体，并能促进美拉德反应^[20]。热风干燥大曲于实验室贮存对 *Kroppenstedtia* 属和 *Bacillus*(芽孢杆菌属)细菌的生长有促进作用，大部分 *Bacillus*(芽孢杆菌属)细菌能分泌淀粉酶和蛋白酶等水解酶，可将淀粉和蛋白质转化为葡萄糖和氨基酸，为白酒风味物质的合成提供前体^[21]。随着贮存时间的增加，实验室贮存能使热风干燥大曲的 *Paenibacillus*(类芽孢杆菌属)、*Pseudogracilibacillus*(假纤细芽孢杆菌属)、*Kroppenstedtia* 和 *Melghirimyces*(迈勒吉尔霉菌属)细菌的丰度进一步提升。此外，大曲经过干燥后，*Thermoactinomyces*(高温放线菌属)细菌的丰度较高，曲库贮存一个月后 *Pseudomonas*(假单胞菌属)和 *Pelomonas* 属细菌丰度较高，而贮存二个月后丰度较高的菌属变为 *Brevibacterium*(短杆菌属)。

3.2 经热风干燥后大曲的细菌群落结构受微环境中水活度、淀粉和水分影响较大，而酸度因子对在曲库贮存 2 个月后的热风干燥大曲的细菌群落结构影响较大。随着大曲贮存时间的增加，于曲库贮存的热风干燥大曲细菌数量趋于稳定。

参考文献

[1] Wang Hai-Yan, Zhang Xiao-Jun, Zhao Li-Ping, 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

[2] 赵金松,张立强,郑佳,等.浓香大曲特征与工艺的相关性[J].食品与发酵工业,2013,39(12):50-55

ZHAO Jin-song, ZHANG Li-qiang, ZHENG Jia, et al. Correlations between characteristics of Luzhou-flavor Daqu and its manufacture technology [J]. Food and Fermentation Industries, 2013, 39(12): 50-55

[3] Zhang Chun-lin, Ao Zong-Hua, Chui Wei-Qiang, et al.

- Characterization of the aroma-active compounds in Daqu: a tradition Chinese liquor starter [J]. *European Food Research and Technology*, 2012, 234: 69-76
- [4] Zhang Wen-Xue, Wu Zheng-Yun, Zhang Qi-Sheng, et al. Combination of newly developed high quality Fuqu with traditional Daqu for Luzhou-flavor liquor brewing [J]. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 2009, 25(10): 1721-1726
- [5] 敖宗华, 陕小虎, 沈才洪, 等. 我国浓香型大曲产业发展概况 [J]. *酿酒科技*, 2011, 1: 78-81
AO Zong-hua, SHAN Xiao-hu, SHEN Cai-hong, et al. Review of industrial development of Luzhou-flavor Daqu in China [J]. *Liquor-Making Science & Technology*, 2011, 1: 78-81
- [6] 周平, 罗惠波, 黄丹, 等. 酒曲害虫的种类、危害及其防治研究进展 [J]. *酿酒科技*, 2015, 9: 102-106
ZHOU Ping, LUO Hui-bo, HUANG Dan, et al. Research progress in types, hazards, and prevention/control measures of insects in distiller's yeast [J]. *Liquor-Making Science & Technology*, 2015, 9: 102-106
- [7] 周平, 罗惠波, 黄丹, 等. 中温热处理对酒曲害虫杀灭效果的研究 [J]. *中国酿造*, 2015, 34(12): 64-68
ZHOU Ping, LUO Hui-bo, HUANG Dan, et al. Effect of moderate temperature heat treatment on pest mortality in jiuqu [J]. *China Brewing*, 2015, 34(12): 64-68
- [8] 周平, 罗惠波, 黄丹, 等. 中温热处理杀虫技术对大曲质量影响 [J]. *食品研究与开发*, 2016, 37(24): 16-20
ZHOU Ping, LUO Hui-bo, HUANG Dan, et al. Influence of mid-temperature heat processing insecticidal technology on Daqu quality [J]. *Food Research and Development*, 2016, 37(24): 16-20
- [9] 周平, 罗惠波, 黄丹, 等. 不同热处理大曲对白酒酿造的影响研究 [J]. *食品科技*, 2016, 8: 39-44
ZHOU Ping, LUO Hui-bo, HUANG Dan, et al. Influence of the different heat processing over the yeast on liquor-brewing [J]. *Food Science and Technology*, 2016, 8: 39-44
- [10] Wang Chang-lu, Shi Dong-jian, Gong Guo-li. Microorganisms in Daqu: a starter culture of Chinese Maotai-flavor liquor [J]. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 2008, 24(10): 2183-2190
- [11] 赵金松, 郑佳, 沈才洪, 等. 基于磷脂脂肪酸分析技术的大曲微生物群落结构多样性研究 [J]. *食品工业科技*, 2017, 1: 160-164
ZHAO Jin-song, ZHENG Jia, SHEN Cai-hong, et al. Research on Daqu microbiological community structure diversity base on phospholipid fatty acid analysis technology [J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2017, 1: 160-164
- [12] Li Xiao-ran, Ma En-bo, Yan Liang-zhen, et al. Bacterial and fungal diversity in the starter production process of fen liquor, a traditional Chinese liquor [J]. *Journal of Microbiology*, 2013, 51(4): 430-438
- [13] Wang Hai-yan, Xu Yan. Effect of temperature on microbial composition of starter culture for Chinese light aroma style liquor fermentation [J]. *Applied Microbiology*, 2014, 60: 85-91
- [14] 黄莹娜, 熊小毛, 胡远亮, 等. 基于 PCR-DGGE 和高通量测序分析白云边酒窖泥细菌群落结构与多样性 [J]. *微生物学通报*, 2017, 44(2): 375-383
HUANG Ying-na, XIONG Xiao-mao, HU Yuan-liang, et al. Bacterial community and diversity in pit mud of baiyunbian liquor analyzed by PCR-DGGE and high-throughput sequencing [J]. *Microbiology China*, 2017, 44(2): 375-383
- [15] Li Xiao-ran, Ma En-bo, Yan Liang-zhen, et al. Bacterial and fungal diversity in the traditional Chinese liquor fermentation process [J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2011, 146: 31-37
- [16] 邢钢, 敖宗华, 王松涛, 等. 不同温度大曲制曲过程理化指标变化分析研究 [J]. *酿酒科技*, 2014, 6: 20-23
XING Gang, AO Zong-hua, WANG Song-tao, et al. Analysis of the change in physicochemical indexes during the production process of Daqu of different temperature [J]. *Liquor-Making Science & Technology*, 2014, 6: 20-23
- [17] Wu Qun, Chen Liang-qiang, Xu Yan. 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
- [18] 孟镇, 熊正河, 钟其顶, 等. 应用 PCR-DGGE 技术解析白酒大曲细菌群落结构 [J]. *食品与发酵工业*, 2010, 10: 159-162
MENG Zhen, XIONG Zheng-he, ZHONG Qi-ding, et al. Application of PCR-DGGE to analysis of bacteria community structure of Daqu [J]. *Food and Fermentation Industries*, 2010, 10: 159-162
- [19] 邓杰, 卫春会, 边名鸿, 等. 浓香型白酒不同窖龄窖池窖泥中古菌群落结构分析 [J]. *食品科学*, 2017, 38(8): 37-42
DENG Jie, WEI Chun-hui, BIAN Ming-hong, et al. Archaeal community analysis in the pit mud of Luzhou-flavor liquor with different age [J]. *Food Science*, 2017 38(8): 37-42
- [20] 高亦豹, 王海燕, 徐岩. 利用 PCR-DGGE 未培养技术对中国白酒高温和中温大曲细菌群落结构的分析 [J]. *微生物学通*

报,2010,37(7):999-1004

GAO Yi-bao, WANG Hai-yan, XU Yan. PCR-DGGE analysis of the bacterial community of Chinese liquor high and medium temperature Daqu [J]. Microbiology China, 2010, 37(7): 999-1004

[21] Zhang Li-qiang, Wu Chong-de, Ding Xiao-feng, et al. Characterisation of microbial communities in Chinese liquor fermentation starters Daqu using nested PCR-DGGE [J]. World Journal of Microbiology & Biotechnology, 2014, 30(12): 3055-3063

现代食品科技