

宏基因组学分析酱香型白酒窖内发酵优势菌与代谢功能的相关性

麻颖焱, 胡萍, 孙利林, 田亚

(贵州大学酿酒与食品工程学院, 贵州贵阳 550025)

摘要: 本文采用宏基因组学技术对酱香型白酒第四轮次窖内酒醅的优势菌区系变化、代谢功能差异及其相关性进行分析研究。结果表明, 窖内酒醅处于酸性环境, 发酵 30 d 风味与发酵 0 d 相比醇、酸类含量增加, 酯类种类丰富; 菌群多样性呈降低趋势, 共发现细菌属 409 个, 真菌属 40 个; 发酵 30 d 时优势细菌为乳球菌属 (33.83%)、肠球菌属 (32.4%)、芽孢杆菌属 (14.07%) 和分枝杆菌属 (8.62%) 等, 优势真菌为裂殖酵母属 (22.26%)、曲霉属 (19.58%)、丝衣霉属 (14.64%) 和毕赤酵母属 (13.78%) 等。KEGG 分析表明碳水化合物代谢和氨基酸代谢为窖内发酵的主要代谢功能, 其中曲霉属、莫氏黑粉菌属和毕赤酵母属与两种主要代谢功能具有强的正相关性, 而乳球菌属、芽孢杆菌属和分枝杆菌属与其呈现较强负相关。研究结果为解析优势发酵菌及其代谢功能对酱香风味形成提供重要参考。

关键词: 酱香型白酒; 宏基因组; 优势菌; 代谢功能

文章编号: 1673-9078(2020)06-128-136

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2020.6.1251

Metagenomics Analyze the Relationship between the Dominant Bacteria and Fungi and Metabolism Function in the Pit Fermentation of Maotai-flavor Liquor

MA Ying-yao, HU Ping, SUN Li-lin, TIAN Ya

(School of Liquor and Food Engineering, Guizhou University, Guiyang 550025, China)

Abstract: In this work, metagenomics technology was used to study and analyze the dominant bacteria and fungi communities change, metabolic function difference and correlation of fermented grains in the fourth round of Maotai-flavor liquor cellar. The results showed that the pit fermentation grains were in acid environment, the content of alcohol and acid in 30 days fermentation were higher than that of 0 days fermentation, and the types of esters were more abundant. The diversity decreased after 30 days fermentation, and a total of 409 bacteria genera and 40 fungi genera were found in pit fermentation grains. The dominant bacteria at 30 days fermentation were *Lactococcus* (21.3%), *Enterococcus* (21.71%), *Bacillus* (10.92%) and *Mycolicibacterium*(8.26%), etc. The dominant fungi were *Schizosaccharomyces* (22.26%), *Aspergillus* (19.58%), *Byssoschlamys*(14.64%) and *Pichia* (13.78%). The KEGG analysis showed that carbohydrate metabolism and amino acid metabolism were the main metabolic functions of microorganism during pit fermentation. *Aspergillus*, *Moesziomyces*, *Pichia* had strong positive correlations with the two major metabolic functions, while the *Lactococcus*, *Bacillus* and *Mycolicibacterium* were negatively correlated with them. These results could provide an important reference for the analysis of dominant fermentation microorganisms and their metabolic functions in the formation of Maotai-flavor.

引文格式:

麻颖焱,胡萍,孙利林,等.宏基因组学分析酱香型白酒窖内发酵优势菌与代谢功能的相关性[J].现代食品科技,2020,36(6):128-136

MA Ying-yao, HU Ping, SUN Li-lin, et al. Metagenomics analyze the relationship between the dominant bacteria and fungi and metabolism function in the pit fermentation of Maotai-flavor liquor [J]. Modern Food Science and Technology, 2020, 36(6): 128-136

收稿日期: 2019-12-19

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31460444)

作者简介: 麻颖焱 (1995-), 男, 硕士研究生, 研究方向: 食品科学与工程

通讯作者: 胡萍 (1970-), 女, 博士, 教授, 研究方向: 食品生物技术

Key words: Maotai-flavor liquor; metagenomics; dominant bacteria and fungi; metabolic function

酱香型白酒是中国最具代表性和独特性的蒸馏酒之一,以酱香突出、酒体醇厚、空杯留香等特点而闻名^[1]。酱香型白酒是以糯红高粱作为原料,高温大曲为发酵剂,经高温堆积发酵、高温窖内发酵和高温馏酒而制成的,其特殊的工艺造就了酱香型白酒独特的酱香风味。堆积发酵是一个开放式的过程,该过程的主要作用在于网罗堆积场地和空气中的微生物进行糖化发酵,并在多种酶类的作用下合成酱香风味物质及前体物质,为后续的窖内发酵提供重要基础^[2,3];窖内发酵是白酒的主体发酵过程,伴随着发酵的进行,窖池内的微生物区系不断的变化,微生物的代谢作用也在演变,发酵糟醅中的各种物质形态也随之产生和消失^[4],最终形成酱香风味。研究证实窖内酒醅所产生的酱香典型酒体风味是决定酱香型白酒风味及质量的关键^[5],可见窖内发酵对酱香型白酒风味物质的形成起着重要的作用,研究窖内阶段的微生物及其代谢功能对揭示酱香型白酒独特风味的形成十分重要。

关于酱香型白酒窖内发酵酒醅中的微生物区系变化的研究已有一些报道。李欣^[6]、黄蕴利^[7]等人利用高通量测序技术分析窖内酒醅的优势细菌为乳杆菌属、芽孢杆菌属和醋酸杆菌属,优势真菌为酿酒酵母属、青霉菌属、毕赤酵母属和曲霉属,其中乳酸杆菌属和酿酒酵母属在窖内酒醅中最高可达95.21%和44.59%;陈林^[8]通过DGGE发现窖内酒醅的优势细菌为乳杆菌属和不动杆菌属;郭敏^[9]等人对比3轮次和7轮次的发酵酒醅发现不同轮次的优势菌也不同,3轮次的优势细菌为乳杆菌属和芽孢杆菌属,优势真菌为嗜热真菌属和嗜热子囊菌属,7轮次的优势细菌为盐单胞菌属,优势真菌为隐球菌属。

但是,关于酱香型白酒窖内发酵酒醅中优势菌区系变化和它们各自的发酵代谢功能变化还未明确。随着生物技术的快速发展,宏基因组学技术被广泛应用到食品发酵机制的研究中。Jung^[10]等人对韩国泡菜的研究中指出了宏基因组学不仅能监控到发酵过程中微生物区系的变化,还能分析微生物代谢功能的变化。国内也有学者成功利用宏基因组学对普洱茶^[11,12]、食醋^[13]以及黄酒^[14]在发酵过程中的微生物及代谢功能变化进行了研究,发现不同发酵食品中微生物初级功能都是以新陈代谢为主,但其次级功能的变化趋势各不相同,各具特点。

本研究采用宏基因组技术,针对酱香型白酒最具有代表性、酒体风味和品质最佳的第四轮次发酵的窖内酒醅进行多样性研究,并分析研究其中优势菌及其

代谢功能的相关性和差异性,为酱香型白酒发酵机制和酱香风味形成机理的研究提供基础和参考。

1 材料与方法

1.1 样品

酒醅:采集于贵州省茅台镇某酱香型白酒酒厂第四轮次窖内酒醅,共6个样品,分别采集于窖内发酵第0 d(3个重复,D0-1,2,3)和窖内发酵第30 d(3个重复,D30-1,2,3);取样方法采用混合取样,取上层酒醅(离窖顶10 cm处)、中层酒醅(离窖底100~120 cm处)和底层酒醅(离窖底20~30 cm处)混匀为一个样品放于无菌采样袋密封。样品采集后迅速置于-80 °C条件下保存备用。

1.2 检测方法

水分含量根据GB 5009.3-2016《食品中水分含量测定》进行测定;

pH值使用便携式pH计(PHS-3C, INESA, China)进行测定;

总酸根据GB/T 12456-2008《食品中总酸的测定》进行测定;

还原糖根据GB 5009.7-2016《食品中还原糖的测定》进行测定;

粗蛋白含量根据GB 5009.5-2016《食品中蛋白质含量的测定》中全自动凯氏定氮法进行测定。

1.3 挥发性风味检测

采用HS-SPME-GC-MS测定窖内酒醅挥发性风味成分^[15]。

(1)HS-SPME条件:取样品约3 g,置于15 mL固相微萃取仪采样瓶中,插入装50/30 μm DVB/CAR/PDMS Stableflex(2 cm)纤维头的手动进样器,在80 °C条件下顶空萃取40 min,快速移出萃取头并立刻插入气相色谱仪(GC)进样口(温度250 °C)中,热解析3 min后进样。

(2)GC条件:色谱柱为ZB-5MSI 5% phenyl-95% dimethylpolysiloxane 弹性石英毛细管;升温程序:40 °C保留2 min,2 °C/min升温至270 °C,保留48 min;汽化室温度250 °C,载气为高纯氦气(He);载气流量1.0 mL/min;溶剂延迟1 min。

(3)MS条件:离子源为电子轰击离子源,温度230 °C;四级杆温度150 °C;发射电流34.6 μA;电压

1294 V; 接口温度 280 °C。

(4) 定性定量分析: 总离子流色谱图中的各峰经质谱计算机数据系统检索和 Wiley 275 标准质谱图核对应定性, 用峰面积归一法测定各成分的相对质量分数。

1.4 DNA 提取及测序

酒醅中的总 DNA 提取采用土壤基因组 DNA 提取试剂盒 (DP336, TIANGEN BIOTECH (BEIJING) CO.,LTD) 提取, 在 Illumina HiSeq 2500 测序平台对本样本进行双端测序, 获得原始数据后采用 Illumina 测序平台对原始数据进行严格序列质控步骤。

1.5 物种组成及功能注释

物种组成注释利用 Kraken2^[16]和自建数据库对质控后的数据结果进行注释, 物种代谢功能注释利用 HUMAnN2^[17]软件与 KEGG 数据库进行注释。

1.6 数据处理

所得试验数据均采用 R 软件(3.6.1)、SPSS 16.0 和 Origin 2018 进行计算与绘图, 本文中所得数值为三个重复的均值。

2 结果与分析

2.1 测序结果统计

经 Illumina HiSeq 2500 平台测序后从 6 个样品中共得到 32.34 G 的原始碱基数, 平均每个样本 5.39 G,

经数据预处理去除低质量数据后得到第 0 d 和 30 d 的 Clean Reads 长度为 35090511 bp 和 34933981 bp 碱基对, 分别占据原始读长的 97.68%和 97.25%, GC 含量分别达到 46.33%和 42.67%。

2.2 菌群多样性分析

菌群多样性通常用 Shannon 指数和 Simpson 指数表示, 数值越大则代表样本中的菌群多样性越丰富。窖内发酵阶段的菌群多样性变化结果如图 1 所示: 第 0 d 的 Shannon 指数和 Simpson 指数显著高于第 30 d 的酒醅($p < 0.05$), 说明菌群多样性在窖内发酵阶段呈降低趋势且差异显著。

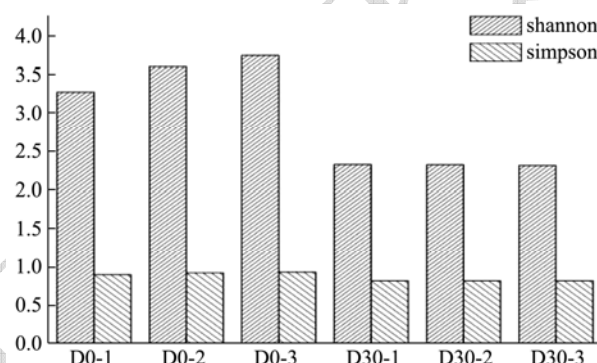


图 1 酒醅发酵 0 d 与 30 d 的 Shannon 与 Simpson 指数

Fig.1 Shannon and Simpson indexes of fermented grains at 0 and 30 days

2.3 环境因子

表 1 酒醅发酵 0 d 与 30 d 环境因子变化

Table 1 Changes of environmental factors at 0 and 30 days

	水分/%	pH	总酸/(g/kg)	粗蛋白/%	还原糖/%
D0-1	53.86±0.62	3.65±0.005	5.48±0.06	10.913±0.2	10.4±0.56
D0-2	54.23±0.83	3.64±0.02	5.44±0.12	10.828±0.75	11.8±0.66
D0-3	51.65±0.71	3.65±0.02	5.4±0.15	10.857±0.4	10.2±0.3
D30-1	53.66±0.4	3.55±0.005	6.91±0.14	6.685±0.46	8.1±0.82
D30-2	55.89±0.96	3.56±0.01	6.88±0.29	6.754±0.31	8.3±0.36
D30-3	53.81±1.28	3.56±0.03	6.94±0.36	6.706±0.26	7.6±0.46

注: *表格数值为均值±标准偏差。

在窖内发酵阶段, 酒醅处于完全封闭式的环境中, 窖内环境的改变直接影响着不同菌群的生长代谢。通过环境因子的检测(表 1)可知, 发酵 0 d 与发酵 30 d 酒醅相比, 水分从 53.25%增加至 54.45%, pH 从 3.65 减少至 3.56, 总酸从 5.44 g/kg 增加至 6.91 g/kg, 粗蛋白和还原糖含量分别从 10.87%和 10.81%减少至 6.72%和 8.12%, 说明窖内发酵是处于潮湿且偏酸环境中, 且该阶段持续代谢产酸, 导致 pH 的下降和总酸

的增加, 这对于酯化反应的进行是有利的, 而蛋白质和还原糖为微生物代谢及风味物质的产生提供物质条件, 因此含量减少。

2.4 细菌与真菌群落结构分析

2.4.1 细菌群落结构

窖内发酵 0 d 与 30 d 酒醅中细菌在门、属水平上的分类结果见表 2 和图 2。

在门水平上, 测序结果共发现 14 个门, 但只有 3 个门(厚壁菌门、变形菌门和放线菌门)的含量在 0.5% 以上。如表 2 所示, 在 0 d 厚壁菌门的含量为 68.63%,

在 30 d 时增加到了 86.53%, 为绝对优势菌门, 而变形菌门和放线菌门在 0 d 与 30 时分别从 19.90%、10.60%减少到 3.66%、9.77%。

表 2 酒醅细菌在门水平的含量

Table 2 Content of bacteria in fermented grains at phylum level

	D0-1	D0-2	D0-3	D30-1	D30-2	D30-3
Firmicutes/%	73.99	65.27	66.64	86.92	85.92	86.76
Proteobacteria/%	14.12	23.49	22.1	3.71	3.64	3.62
Actinobacteria/%	11.62	10.71	9.45	9.32	10.41	9.59
Others/%	1.68	2.02	3.21	0.09	0.09	0.09

注: *含量小于 0.5%的细菌门归为 others。

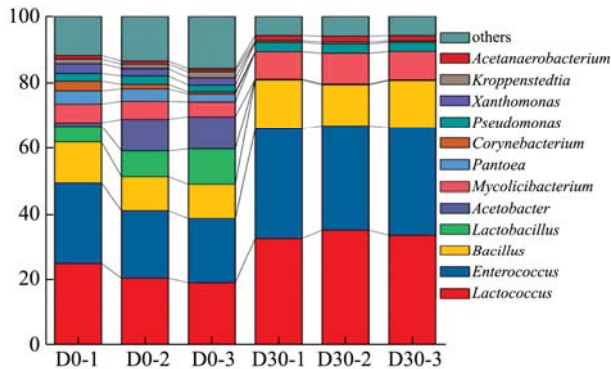


图 2 酒醅细菌在属水平的含量(含量小于 1%的归为 others)

Fig.2 Content of bacteria in fermented grains at genera level (Content less than 1% are classified as others)

在属水平上, 测序结果共发现了 409 个属, 但只有 12 个属的含量在 1%以上。如图 2 所示, 在 0 d 时, 肠球菌属含量最高, 达到了 22.02%, 其次是乳酸球菌

属 (21.61%)、芽孢杆菌属 (11.02%)、乳酸杆菌属 (7.95%)、醋酸菌属 (7.02%)、分枝杆菌属 (5.34%)、泛菌属 (3.51%)、黄杆菌属 (2.41%)、假单胞菌属 (2.4%)、棒杆菌属 (1.67%)、克罗彭斯特菌属 (1.52%)。在 30 d 时, 乳球菌属、肠球菌属和芽孢杆菌属为主要优势细菌属, 它们的含量分别达到了 33.85%、32.42%和 14.08%, 分枝杆菌属和假单胞菌属分别增长为 8.62%和 2.83%, 而乳酸杆菌属含量减少为 0.22%, 克罗彭斯特菌属含量为 0.49%, 醋酸菌属、泛菌属、棒杆菌属和黄杆菌属分别为 0%、0.008%、0.007%和 0.001%, 由此可见在窖内发酵阶段, 乳酸杆菌属、克罗彭斯特菌属、醋酸菌属等菌群生长逐渐受到抑制, 而乳球菌属、肠球菌属和芽孢杆菌属等菌群的含量在窖内阶段呈增长趋势。

2.4.2 真菌群落结构

表 3 酒醅真菌在门水平的含量

Table 3 Content of fungi in fermented grains at phylum level

	D0-1	D0-2	D0-3	D30-1	D30-2	D30-3
Ascomycota/%	89.05	81.37	82.89	94	94.09	95.2
Basidiomycota/%	8.73	17.57	13.74	5.99	5.92	4.81
Mucoromycota/%	2.19	1.06	3.32	0	0	0
Chytridiomycota/%	0.03	0	0.05	0	0	0

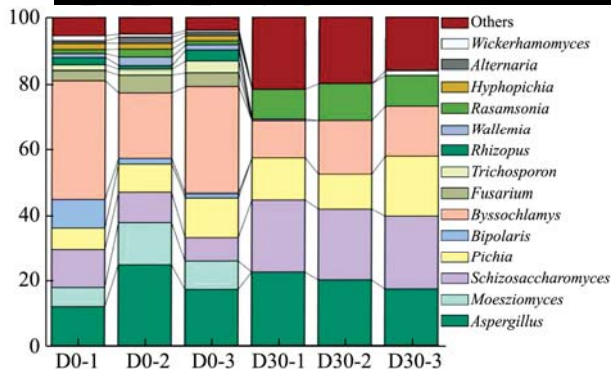


图 3 酒醅真菌在属水平的含量(含量小于 1%的归为 others)

Fig.3 Content of fungi in fermented grains at genera level (Content less than 1% are classified as others)

窖内发酵 0 d 与 30 d 酒醅中真菌在门、属水平上的分类结果见表 3 和图 3。在门水平上, 测序共发现 4 个门(子囊菌门、担子菌门、毛霉菌门和壶菌门)。如表 3 所示, 在 0 d 时子囊菌门的含量为 84.44%, 在 30 d 时增加到了 94.43%, 而担子菌门、毛霉菌门和壶菌门在 0 d 与 30 时分别从 13.35%、2.19%、0.02%减少到 5.57%、0%、0%。

在属水平上, 测序结果共发现了 40 个属, 但只有 14 个属的含量在 1%以上。如图 3 所示, 在 0 d 时, 丝衣霉属含量最高, 达到了 29.81%, 其次是曲霉属 (17.62%)、裂殖酵母属 (9.47%)、莫氏黑粉菌属 (9.21%)、毕赤酵母属 (9.11%)、镰刀菌属 (4.18%)、

离蠕孢属 (3.92%)、丝孢酵母属 (2.23%)、根霉属 (2.19%)、节担菌属 (1.81%)、*Rasamsonia* (1.59%); 在 30 d 时, 裂殖酵母属、曲霉属和丝衣霉属为主要优势真菌属, 它们的含量分别为 22.26%、19.58% 和 14.64%, 毕赤酵母属和 *Rasamsonia* 增长为 13.78%、9.87%, 而节担菌属含量减少为 0.16%。其余多种真菌属含量在 30d 时均无法检测出, 说明窖内阶段大部分真菌属会被淘汰掉, 而青霉属、裂殖酵母属、毕赤酵母属和踝节菌属的含量反而呈增加趋势。

2.5 菌群代谢功能及其变化

在窖内发酵阶段菌群结构发生了明显的变化, 与此同时, 菌群代谢功能也在随之变化。本研究通过将测序结果与 KEGG 数据库进行注释比对, 揭示窖内发酵阶段菌群代谢功能的变化。结果如图 4 所示。

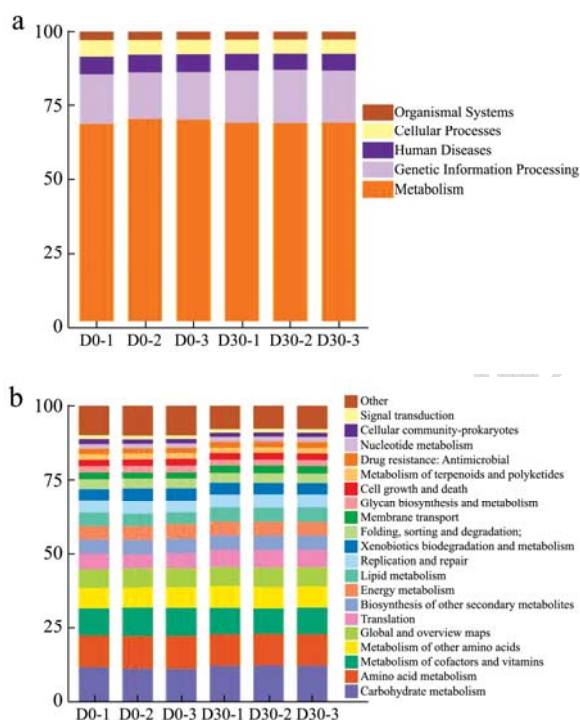


图 4 酒醅菌群代谢功能的变化(a:一级代谢;b:前二十种二级代谢功能)

Fig.4 The changes of bacteria and fungi metabolism function in fermented grains (a: primary metabolism; b: Top 20 secondary metabolism)

KEGG 一级代谢注释结果(图 4a)显示, 在窖内发酵 0 d 和 30 d 时, 新陈代谢(69.94%~69.3%)一直处于绝对优势, 其次是遗传信息处理、人类疾病、细胞加工和组织系统。根据 KEGG 二级代谢注释结果(图

4b)可知, 碳水化合物代谢和氨基酸代谢为窖内阶段的 优势代谢功能, 其次为辅酶因子与维生素代谢、其它氨基酸代谢; 在第 0 d 时, 碳水化合物代谢占比为 15.81%, 氨基酸代谢为 15.66%, 辅酶因子和维生素代谢为 13.96%, 其它氨基酸代谢为 9.82%; 而在 30 d 时, 碳水化合物代谢的含量增加到了 17.2%, 氨基酸代谢、辅酶因子与维生素代谢和其它氨基酸代谢分别为 15.37%, 13.23%和 10.48%。以上结果表明在窖内发酵阶段碳水化合物和氨基酸都存在较为旺盛的代谢特征。不同氨基酸能呈现不同的风味, 对白酒香型及口感形成中起着重要作用^[18]。

大量研究表明, 酱香型白酒高温发酵过程中产生美拉德反应可形成一系列的香味物质, 如吡嗪、呋喃、醛、酚类等^[19]。本研究则进一步说明在酱香型白酒窖内发酵条件下, 代谢功能中最旺盛的碳水化合物和氨基酸代谢可为美拉德反应和酱香风味的形成提供反应基础和物质基础。

2.6 窖内酒醅风味物质的差异

酱香型白酒窖内发酵阶段菌群结构、代谢功能都具有显著的变化, 同时也伴随着风味物质的形成和消长。本研究通过 HP-SPME-GC-MS 检测窖内发酵 0 d 与 30 d 酒醅挥发性风味物质含量如表 4 所示。

根据 HP-SPME-GC-MS 检测结果发现, 在窖内发酵 0 d 时, 醇类有 8 种, 含量为 30.393%, 醛类有 5 种, 含量为 12.42%, 酸类有 2 种, 含量为 1.676%, 烷烃有 2 种, 含量为 1.113%, 酯类有 25 种, 含量为 52.146%; 而在发酵 30 d 时, 醇类含量增加至 42.213%, 醛类减少至 2.477%, 酸类、烷烃类增加至 6.178%、1.248%, 酯类增加至 29 种, 而含量减少至 46.592%。

由上可知, 窖内酒醅风味物质主要以醇、酯类为主, 且在发酵 30 d 后, 烷烃类物质经微生物代谢产生酸类物质, 醛类物质经氧化作用转化成醇类、酸类物质, 再生成酯类物质, 促进了酱香风味的形成。在窖内酒醅中, 乳酸球菌和乳酸杆菌作为优势细菌, 可发酵糖形成乳酸, 后经酯化作用生产乳酸乙酯, 且芽孢杆菌、醋酸菌能转变糖类生成吡嗪类、醇类、酮类、酯类物质; 研究表明, 曲霉在酱香型白酒生产中能够产生醇、酸、酯等多种芳香初级代谢产物, 对白酒的产酒和产香起到积极作用^[20], 酵母中的裂殖酵母与毕赤酵母在酱香型白酒中发酵力强, 能代谢产生高级醇、酸、酯等风味物质^[21,22], 在酿造过程中发挥重要作用。

表4 窖内酒醅挥发性风味成分的变化

Table 4 Changes of flavor components of fermented grains in alcoholic fermentation in pit

名称	D0/%	D30/%	名称	D0/%	D30/%
乙醇	28.133	37.295	乙酸乙酯	2.442	5.907
丙醇	0.831	0.233	丙酸乙酯	0.058	0.118
仲丁醇	0.089	-	乙酸丙酯	0.117	0.104
异丁醇	0.073	0.19	乙酸异丁酯	-	0.046
丙二醇	0.107	-	丁酸乙酯	3.501	2.04
正丁醇	0.581	-	乳酸乙酯	5.364	17.41
异戊醇	0.252	0.998	乙酸异戊酯	0.531	0.35
2-甲基戊醇	0.327	-	2-甲基乙氧丁酯	-	0.157
2,3-丁二醇	-	1.911	丁酸丙酯	0.424	0.052
2,6-二甲基庚醇	-	0.633	戊酸乙酯	2.546	0.658
苯乙醇	-	0.882	丁酸丁酯	0.63	-
丁醇	-	0.071	乙酸己酯	0.21	0.078
合计	30.393	42.213	己酸丁酯	0.804	0.086
乙醛	0.134	0.118	辛酸乙酯	2.111	1.012
3-甲基丁醛	0.341	0.209	乙酸苯乙酯	0.603	0.485
2-甲基丁醛	-	0.068	壬酸乙酯	0.218	0.201
糠醛	0.341	1.782	苯丙酸乙酯	0.238	0.139
苯甲醛	11.377	0.147	癸酸乙酯	0.382	0.767
苯乙醛	0.227	0.153	己酸丙酯	0.687	0.054
合计	12.42	2.477	十二酸乙酯	0.555	0.569
乙基苯乙酸	-	1.343	十四酸乙酯	0.718	0.518
乙酸	0.362	4.835	十五酸乙酯	0.81	0.475
丁酸	1.314	-	9-棕榈酸乙酯	0.667	0.374
合计	1.676	6.178	亚油酸乙酯	3.487	2.255
十一烷	0.964	0.529	油酸乙酯	7.949	1.369
苯乙烯	-	0.177	硬脂酸乙酯	0.731	-
α -姜烯	0.149	0.294	癸烯酸乙酯	-	0.157
十四烯	-	0.109	十八酸乙酯	-	0.076
十五烯	-	0.069	2-甲酸糠酯	-	0.245
α -花柏烯	-	0.07	己酸乙酯	-	4.177
合计	1.113	1.248	棕榈酸乙酯	16.363	6.713
			合计	52.146	46.592

注：“-”代表并未检出。

2.7 环境因子对优势菌群的影响

为揭示窖内阶段环境因子对优势菌群变化的影响,利用冗余分析(RDA)对其进行研究,冗余分析(图5)解释了优势菌群变化的92.17%,结果表明在总酸、水分、粗蛋白、pH和还原糖中,总酸对菌群变化的影响最大,其次是粗蛋白、pH、还原糖和水分。进一步

分析指出其中乳球菌属、肠球菌属、分枝杆菌属及芽孢杆菌属与总酸、水分为正相关,与pH、粗蛋白和还原糖为负相关,而乳酸杆菌和醋酸杆菌与总酸、水分为负相关,与pH、粗蛋白和还原糖为正相关;此外,已有研究显示,pH作为窖内发酵的重要因子,它与芽孢杆菌^[23]呈显著负相关,而水分和酸度则与芽孢杆菌、肠细菌等多种微生物呈正相关^[24]。

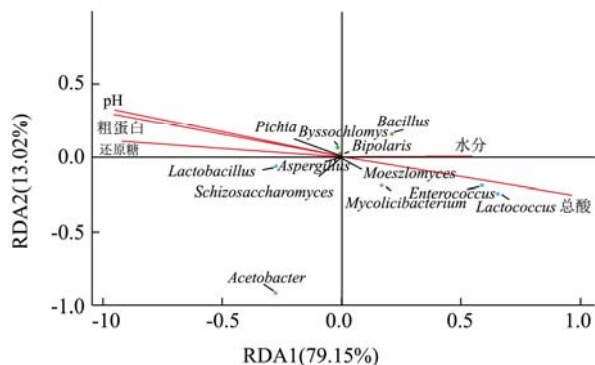


图5 环境因子与优势菌的冗余分析

Fig.5 Redundancy analysis of environmental factors and the dominant microbes

2.8 优势菌群与主要代谢功能的相关性

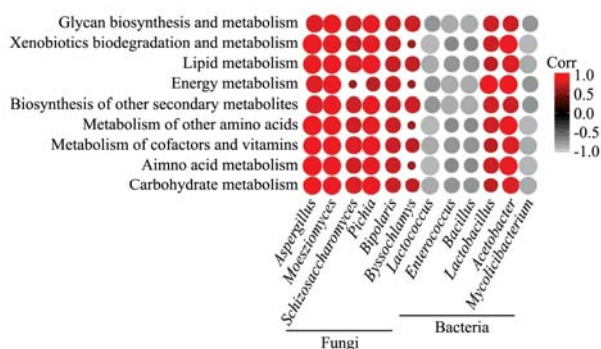


图6 优势菌与代谢功能相关性

Fig.6 Correlation between the dominant microbes and metabolic function

通过 Spearman 算法^[25]对优势细菌、真菌与代谢功能之间的相关性进行计算,结果如图6所示。曲霉属、莫氏黑粉菌属、裂殖酵母属、毕赤酵母属、离蠕孢霉属、丝衣霉属、乳酸杆菌属和醋酸杆菌属与二级代谢功能(氨基酸代谢、碳水化合物代谢、其它氨基酸代谢、辅酶因子与维生素代谢等)之间为正相关,乳酸球菌属、肠球菌属、芽孢杆菌属和分枝杆菌属与二级代谢功能间为负相关;碳水化合物代谢和氨基酸代谢作为主要的代谢功能,其中曲霉属、莫氏黑粉菌属和毕赤酵母属与其具有强的正相关性(>0.886),而乳球菌属、芽孢杆菌属和分枝杆菌属与其呈现较强负相关(<-0.714)。

在酱香型白酒的研究中发现,酱香型白酒酿造过程中曲霉是霉菌中种类最多的真菌,能为发酵提供丰富的酶系(如糖化酶、液化酶、蛋白酶等)^[20];乳酸杆菌代谢产生乳酸等有机酸类物质,抑制酿酒过程中致病菌的生长,且乳酸有利于霉菌等菌群的生长,促进酱香型白酒的发酵^[26-28];酵母作为对出酒率、风味和品质贡献最大的微生物群体^[29],能代谢多种酶类发

酵糖生成酒精,还能代谢酯酶将醇酸结合产生酸酯物质,赋予酒体浓郁的芳香^[30],芽孢杆菌作为酱香型白酒生产中主要的功能菌,可分泌蛋白酶、淀粉酶、纤维素酶等多种酶,对酱香型白酒风味物质的形成发挥重要作用。本研究发现芽孢杆菌属与碳水化合物与氨基酸代谢呈负相关,其原因很可能是因为窖池内厌氧环境不利于芽孢杆菌的代谢,另外芽孢杆菌存在会竞争抑制部分菌群如乳酸菌的生长,降低窖池内的菌群多样性^[31],从而呈现出与碳水化合物和氨基酸代谢负相关。有研究^[32]指出将霉菌与醋酸菌属在一定范围内混合发酵更有利于酒的成香成味,调节酯化酶活性。乳酸球菌属与肠球菌属作为窖内发酵优势细菌,其中乳酸球菌除产乳酸外,还可产生胞外多糖赋予食品特殊的质构和风味^[33];肠球菌属具有良好的生物安全和益生特性,常用于发酵生产中加速发酵过程^[34,35],还能水解蛋白和酯类赋予食品良好的风味以及代谢细菌素,抑制金黄色葡萄球菌、蜡状芽孢杆菌等食源性病原体的生长^[36]。以上各类优势菌及其在酱香型白酒酿造过程中与碳水化合物和氨基酸代谢的具体代谢途径,值得后继深入研究和解析。

3 结论

本研究应用宏基因组学研究酱香型白酒第四轮次的窖内酒醅发酵初期与末期优势菌组成结构及其代谢功能相关性,发现在窖内 pH 值 3.65~3.56 条件下,发酵 30 d 后粗蛋白、还原糖含量下降,醇、酸类含量增加,酯类种类丰富;菌群多样性降低但优势菌群更加突出,其中乳球菌属、肠球菌属、芽孢杆菌属分别达到了 33.85%、33.42%、14.08%;裂殖酵母属、曲霉属和丝衣霉属分别达到了 22.26%、19.58%和 14.64%。KEGG 代谢通路分析揭示了窖内阶段菌群的主要代谢功能为碳水化合物代谢和氨基酸代谢;优势菌群中曲霉属、莫氏黑粉菌属和毕赤酵母属与碳水化合物及氨基酸代谢呈现强的正相关性(>0.886),而乳球菌属、芽孢杆菌属和分枝杆菌属与之呈现较强负相关(<-0.714),表明酱香型白酒窖内高温长时间发酵工艺条件下,优势菌及其碳水化合物代谢和氨基酸代谢可为酱香味物质的形成提供重要的物质基础,起着重要作用。

参考文献

[1] 沈怡方.白酒生产技术全书[M].北京:中国轻工业出版社. 1998:135-143
Shen Yi-fang. Liquor Production Technology Encyclopedia [M]. Beijing: China Light Industry Press. 1998: 135-143

- [2] 周恒刚. 酱香型白酒生产工艺的堆积[J]. 酿酒科技, 1999, 1:15-17
ZHOU Heng-gang. The piling fermentation in the production technology of maotai-flavour liquor [J]. Liquor-making Science & Technology, 1999, 1: 15-17
- [3] 王贵军, 沈才洪, 张洪远, 等. 酱香型白酒糟醅堆积与窖内发酵工艺研究[J]. 酿酒科技, 2011, 5:36-37
WANG Gui-jun, SHEN Cai-hong, ZHANG Hong-yuan, et al. Investigating on accumulation & in-pit fermentation of distiller's grains of maotao-flavor liquor [J]. Liquor-making Science & Technology, 2011, 5: 36-37
- [4] 唐玉明, 姚万春, 任道群, 等. 酱香型白酒窖内发酵过程中糟醅的微生物分析[J]. 酿酒科技, 2007, 12:50-53
TANG Yu-ming, YAO Wan-chun, REN Dao-qun, et al. Analysis of microbes in fermented grains of maotai-flavor liquor during the fermentation in pits [J]. Liquor-making Science & Technology, 2007, 12: 50-53
- [5] 胡峰, 钟方达, 胡建峰, 等. 酱香型白酒窖内不同层次酒醅微生物与酒体风格的研究[J]. 酿酒科技, 2014, 9:48-52
HU Feng, ZHONG Fang-da, HU Jian-feng, et al. Research on microbes in and flavor styles of fermented grains at different depth in Jiangxiang baijiu (liquor) pit [J]. Liquor-making Science & Technology, 2014, 9: 48-52.
- [6] 李欣, 王彦华, 林静怡, 等. 高通量测序技术分析酱香型白酒酒醅的微生物多样性[J]. 福建师范大学学报: 自然科学版, 2017, 33(1):51-59
LI Xin, WANG Yan-hua, LIN Jing-yi, et al. Analysis of microbial diversity in the fermented grains of maotai-flavor liquor using high-throughput sequencing [J]. Journal of Fujian Normal University (Natural Science Edition), 2017, 33(1): 51-59
- [7] 黄蕴利, 黄永光, 胡建峰, 等. 酱香型白酒第二轮次酒发酵过程微生物多样性研究[J]. 中国酿造, 2017, 36(9):30-35
HUANG Yun-li, HUANG Yong-guang, HU Jian-feng, et al. Microbial diversity of the second rounds liquid of moutai-flavor baijiu during fermentation process [J]. China Brewing, 2017, 36(9): 30-35
- [8] 陈林. 酱香型白酒发酵过程中微生物群落结构分析[D]. 北京: 北京林业大学, 2012
CHEN Lin. Study on the bacterial community structure in fermentation of maotai-flavor liquor [D]. Beijing: Beijing Forestry University. 2012.
- [9] 郭敏, 黄永光, 邱树毅, 等. 高通量测序在酱香白酒微生态多样性研究中的应用[J]. 中国酿造, 2017, 36(5):146-151
GUO Min, HUANG Yong-guang, QIU Shu-yi, et al. Application of high-throughput sequencing in the microbial diversity of moutai-flavor baijiu [J]. China Brewing, 2017, 36(5): 146-151
- [10] Jung, J.Y., Lee, S. H., Kim, J.M., et al. Metagenomic analysis of kimchi, a traditional Korean fermented food [J]. App. Environ. Microbiol, 2011, 77(7): 2264-2274
- [11] Li Z, Feng C, Luo X, et al. Revealing the influence of microbiota on the quality of pu-erh tea during fermentation process by shotgun metagenomic and metabolomic analysis [J]. Food Microbiology, 2018, 76: 405-415
- [12] Lyu C, Chen C, Ge F, et al. A preliminary metagenomic study of puer tea during pile fermentation [J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2013, 93(13): 3165-3174
- [13] Wu, L.H., Lu, Z. M., Zhang, X. J., et al. Metagenomics reveals flavour metabolic network of cereal vinegare microbiota [J]. Food Microbiology, 2017, 62: 23-31
- [14] Liu S, Chen Q, Zou H, et al. A metagenomic analysis of the relationship between microorganisms and flavor development in Shaoxing mechanized huangjiu fermentation mashes [J]. International Journal of Food Microbiology, 2019, 303: 9-18
- [15] 杨萍, 胡萍, 樊敏, 等. 酱香型酒曲及窖内酒醅挥发性成分的分析[J]. 中国酿造, 2018, 37(11):166-171
YANG Ping, HU Ping, FAN Ming, et al. Analysis of the volatile components from Jiuqu and fermented grains in the pits of the sauce-flavor Baijiu [J]. China Brewing, 2018, 37(11): 166-171
- [16] Wood D E, Salzberg S L. Kraken: ultrafast metagenomic sequence classification using exact alignments [J]. Genome Biology, 2014, 15(3): R46
- [17] Segata N, Izard J, Waldron L, et al. Metagenomic biomarker discovery and explanation [J]. Genome Biology, 2011, 12(6): R60
- [18] 张巧玲, 吕锡斌, 秦兴, 等. 酱香型白酒高温大曲游离氨基酸比较分析[J]. 中国酿造, 2019, 38(4):59-63
ZHANG Qiao-ling, LYU Xi-bin, QIN Xing, et al. Comparative analysis of free amino acids in high temperature daqu of moutai-flavor baijiu [J]. China Brewing, 2019, 38(4): 59-63
- [19] 庄名扬. 再论美拉德反应产物与中国白酒的香和味[J]. 酿酒科技, 2005, 5:22-26
ZHUANG Ming-yang. Reaction products of maillard reaction and flavors & tastes of Chinese liquors [J]. Liquor-making Science & Technology, 2005, 5: 22-26.
- [20] 徐佳, 邱树毅, 胡宝东, 等. 酱香型白酒酿造过程中霉菌的功能性研究[J]. 酿酒, 2015, 42(5):32-38

- XU Jia, QIU Shu-yi, HU Bao-dong, et al. Research on function of the mold in maotai-flavor liquor brewing [J]. *Liquor Making*, 2015, 42(5): 32-38
- [21] 黄永光, 湛永前, 吴广黔, 等. 酱香白酒堆积发酵过程酒醅中酵母菌的分析研究[J]. *酿酒科技*, 2013, 6: 14-19
- HUANG Yong-guang, CHEN Yong-qian, WU Guang-qian, et al. Analysis of yeast strains in fermented grains during stacking fermentation of jiang-flavor liquor [J]. *Liquor-making Science & Technology*, 2013, 6: 14-19
- [22] 庞博. 酱香型大曲酒酿造过程酵母微生物生态及功能菌株筛选 [D]. 贵阳: 贵州大学, 2014
- PANG Bo. Yeast microecology and functional strain screening in the brewing process of maotai flavor daqu liquor [D]. Guiyang: Guizhou University, 2014
- [23] 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 [J]. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2016, 82(8): 2506-2515
- [24] Li P, Lin W, Liu X, et al. Environmental factors affecting microbiota dynamics during traditional solid-state fermentation of Chinese daqu starter [J]. *Frontiers in Microbiology*, 2016, 7: 1237
- [25] Zhu Y, Zhang F, Zhang C, et al. Dynamic microbial succession of Shanxi aged vinegar and its correlation with flavor metabolites during different stages of acetic acid fermentation [J]. *Scientific Reports*, 2018, 8(1): 8612
- [26] Ravyts F, De Vuyst L. Prevalence and impact of single-strain starter cultures of lactic acid bacteria on metabolite formation in sourdough [J]. *Food Microbiology*, 2011, 28(6): 1129-1139
- [27] 郭敏, 黄永光, 邱树毅, 等. 高通量测序在酱香白酒微生物多样性研究中的应用[J]. *中国酿造*, 2017, 36(5): 146-151
- GUO Min, HUANG Yong-guang, QIU Shu-yi, et al. Application of high-throughput sequencing in the microbial diversity of moutai-flavor baijiu [J]. *China Brewing*, 2017, 36(5): 146-151
- [28] 黄永光. 酱香型白酒酿造中 *Aspergillus hennebergii* 及其分泌酸性蛋白酶的研究[D]. 无锡: 江南大学, 2014
- HUANG Yong-guang. Study on Secretomo and Acid Protease of *Aspergillus hennebergii* from the Brewing Process of Moutai-liquor [D]. Wuxi: Jiangnan University, 2014
- [29] Wu Q, Chen LQ, Xu Y. 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
- [30] 陈美竹, 邱树毅, 胡宝东, 等. 酱香型白酒酿造体系中酵母菌研究进展[J]. *中国酿造*, 2015, 34(6): 5-10
- CHEN Mei-zhu, QIU Shu-yi, HU Bao-dong, et al. Research progress of yeast in moutai-flavor liquor production [J]. *China Brewing*, 2015, 34(6): 5-10
- [31] 王鹏. 地衣芽孢杆菌强化对浓香型白酒酿造微生物群落结构和代谢的影响[D]. 无锡: 江南大学, 2017
- WANG Peng. Effects of *Bacillus licheniformis* inoculation on the microbial community structure and metabolism during strong flavored liquor brewing process [D]. Wuxi: Jiangnan University, 2017
- [32] 王俊英, 侯小歌, 张杰, 等. 高产酯化酶霉菌和醋酸菌混合发酵初探[J]. *江苏农业科学*, 2013, 41(10): 317-319
- WANG Jun-ying, HOU Xiao-ge, ZHANG Jie, et al. A preliminary study on the mixed fermentation of high esterase producing mould and acetobacter [J]. *Jiangsu Agricultural Sciences*, 2013, 41(10): 317-319
- [33] 尤新. 功能性发酵制品[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 1998, 20(2): 14-16
- YOU Xin. Functional Fermented Products [M]. Beijing: China Light Industry Press, 1998, 20(2): 14-16
- [34] Drahovská H, Kocíncová D, Seman M, et al. PCR-based methods for identification of *Enterococcus* species [J]. *Folia Microbiologica*, 2002, 47(6): 649
- [35] Moreno M R F, Sarantinopoulos P, Tsakalidou E, et al. The role and application of enterococci in food and health [J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2006, 106(1): 1-24
- [36] Giraffa G. Enterococcal bacteriocins: their potential as anti-*Listeria* factors in dairy technology [J]. *Food Microbiology*, 1995, 12: 291-299