

# 多菌共酵体系下枯草芽孢杆菌对微生物群落结构及代谢的影响

曾鹏<sup>1</sup>, 李子健<sup>1,2</sup>, 刘丹<sup>3</sup>, 陈杰<sup>4</sup>, 唐世超<sup>4</sup>, 黄丹<sup>1,2</sup>, 罗惠波<sup>1,2\*</sup>

(1. 四川轻化工大学生物工程学院, 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. 千禾味业食品股份有限公司, 四川眉山 620000) (4. 宜宾六尺巷酒业有限公司, 四川宜宾 644000)

**摘要:** 研究接种大曲中优势菌属枯草芽孢杆菌后在混菌发酵下微生物群落改变, 分析代谢产物的差异。采用高通量测序技术、HS-SPME-GC-MS、PLS-DA 分析接种前后的微生物群落结构和代谢的差异, 采用斯皮尔曼 (Spearman) 相关性分析接种前后微生物与差异风味物质的相关性。研究表明接种枯草芽孢杆菌后微生物的相对丰度有明显的变化, 其中变化最大的为 *Bacillus* 从 76.56% 降为 0.04%, *Enterobacter* 从 0.01% 上升为 71.53%, *Pichia* 从 62.17% 降为 12.89%, 且由 LEfSE 分析可知接种后群落结构也有明显的变化。产物分析中, 接种前后代谢产物有明显差异, 己酸乙酯、2,3,5,6-四甲基吡嗪、乙酸乙酯等 19 种代谢物是显著差异代谢产物, 由相关性分析可知, 代谢产物的变化与接种后有显著变化的微生物有关, 接种枯草芽孢杆菌后会影响到微生物的变化, 从而使代谢产物产生变化。该研究揭示了接种枯草芽孢杆菌后混菌发酵下群落结构与代谢产物的差异及其两者间的相关性, 为阐明枯草芽孢杆菌在多菌共菌发酵体系中的作用提供基础数据。

**关键词:** 大曲; 枯草芽孢杆菌; 微生物群落; 代谢产物; 相关性分析

文章编号: 1673-9078(2023)03-112-120

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2023.3.0282

## Effects of *Bacillus subtilis* on Structure and Metabolism of Microbial Community under a Multi-bacteria Co-fermentation System

ZENG Peng<sup>1</sup>, LI Zijian<sup>1,2</sup>, LIU Dan<sup>3</sup>, CHEN Jie<sup>4</sup>, TANG Shichao<sup>4</sup>, HUANG Dan<sup>1,2</sup>, LUO Huibo<sup>1,2\*</sup>

(1.College of Bioengineering, Sichuan University of Science and Engineering, Zigong 643000, China)

(2.Key Laboratory of Brewing Biotechnology and Application, Zigong 643000, China)

(3.QianheWeiye Food Co. Ltd., Meishan 620000, China) (4.Yibin Liuchixiang Co. Ltd., Yibin 644000, China)

**Abstract:** Changes in the microbial community and differences in metabolites following the inoculation of a mixed fermentation system with *Bacillus subtilis*, the dominant species from Daqu, were investigated herein. High-throughput sequencing, HS-SPME-GC-MS, and PLS-DA were used to analyze the differences in microbial community structure and metabolism before and after inoculation, and Spearman correlation analysis was used to examine the correlation between the microorganisms and different flavor compounds. The results showed significant changes in the relative abundance of microorganisms after inoculation with *B. subtilis*, with the most significant changes being *Bacillus* decreasing from 76.56% to 0.04%, *Enterobacter* increasing from 0.01% to 71.53%, and *Pichia* decreasing from 62.17% to 12.89%. LEfSe analysis also revealed notable changes in the community structure after inoculation. The analysis of metabolites revealed significant differences before and after inoculation, with 19 metabolites, such as ethyl hexanoate, 2,3,5,6-tetramethylpyrazine, and ethyl acetate, being significantly different. Inoculation of *Bacillus subtilis* affected microbial changes, leading to variations in metabolites. Correlation analysis

引文格式:

曾鹏,李子健,刘丹,等.多菌共酵体系下枯草芽孢杆菌对微生物群落结构及代谢的影响[J].现代食品科技,2023,39(3):112-120.

ZENG Peng, LI Zijian, LIU Dan, et al. Effects of *Bacillus subtilis* on structure and metabolism of microbial community under a multi-bacteria co-fermentation system [J]. Modern Food Science and Technology, 2023, 39(3): 112-120.

收稿日期: 2022-03-14

基金项目: 四川省科技厅重点研发计划项目 (2019YFS0518); 四川轻化工大学研究生创新基金资助项目 (Y2020064)

作者简介: 曾鹏 (1995-), 男, 硕士研究生, 研究方向: 酿酒工程, E-mail: 2871844059@qq.com

通讯作者: 罗惠波 (1969-), 男, 教授, 研究方向: 酿酒工程, E-mail: susehbluo@163.com

revealed that the changes in metabolites were related to the microorganisms with significant changes after inoculation. We found differences in community structure and metabolites in a mixed fermentation system after inoculation with *B. subtilis* and a correlation between the two, providing fundamental data for understanding the role of *B. subtilis* in a multispecies co-fermentation system.

**Key words:** daqu; *Bacillus subtilis*; microbial community; metabolites; correlation analysis

大曲是一种重要的糖化发酵剂,为白酒生产提供丰富的微生物、重要水解酶和风味化合物,在中国白酒的生产中起着至关重要的作用<sup>[1]</sup>。在复杂的大曲微生物群落中,不同的微生物在大曲生产中发挥着不同的作用,其中枯草芽孢杆菌是浓香型大曲生产过程中的优势微生物<sup>[2]</sup>,且枯草芽孢杆菌是乙偶姻<sup>[3,4]</sup>、四甲基吡嗪<sup>[5]</sup>和呋喃扭尔素等风味物质的重要贡献者。

近年来,在多菌共酵发酵体系中枯草芽孢杆菌的研究也较多,有强化接种枯草芽孢杆菌后研究代谢物的变化或探究强化接种枯草芽孢杆菌后单一的代谢产物的产生与那些微生物有关等。例如黄晓宁等<sup>[6]</sup>发现枯草芽孢杆菌具有高产淀粉酶和蛋白酶的能力,添加枯草芽孢杆菌后4-乙基-2-甲氧基苯酚、辛酸乙酯、3-甲基丁酸乙酯、四甲基吡嗪明显增加。李维维等<sup>[7]</sup>发现添加枯草芽孢杆菌后浓香型白酒中乙酸乙酯相对含量均有所提高,乙酸乙酯相对含量的增加与酵母属菌种有关,且与空白组相比酯类物质含量显著提高。袁庆云等<sup>[8]</sup>也探究了枯草芽孢杆菌与不同酵母菌种在小麦基质上共发酵,发现乙醇和氨基酸的合成代谢存在差异。这些前人的研究都对混菌发酵中枯草芽孢杆菌对整体群落结构的变化与代谢产物变化间的联系的影响研究较少。

本研究以小麦为培养基,接种枯草芽孢杆菌后进行生料发酵,小麦能为固态发酵体系提供大量的微生物来源<sup>[9]</sup>,探究在不同培养条件下枯草芽孢杆菌在混菌发酵体系中,对微生物群落结构及代谢产物的影响,为进一步明确大曲中枯草芽孢杆菌的作用及机制提供基础数据支撑。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

原料:实验室中保存的1株枯草芽孢杆菌 *Bacillus subtilis* A1,市售软质小麦。

试剂: Na<sub>2</sub>EDTA (乙二胺四乙酸二钠)、Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>、NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、氯化钠、蜗牛酶、溶菌酶、CTAB (十六烷基三甲基溴化铵)、SDS (十二烷基硫酸钠),生工生物工程(上海)股份有限公司; Tris-平衡酚 (pH值>7.8),上海博威生物医药有限公司; 三氯甲烷 (分析纯)、无水乙醇 (分析纯),成都市科隆化学品有限公

司; 异戊醇 (分析纯),天津市致远化学试剂有限公司; 异丙醇 (分析纯),天津市津东天正精细化学试剂厂; 乙酸正戊酯 (分析纯),成都市科隆化学品有限公司。

### 1.2 仪器与设备

萃取头 (50/30 μm DVB/CAR on PDMS),上海安谱实验科技股份有限公司; Agilent 7890A5975B 型气相色谱-质谱联用仪,美国安捷伦公司; QL-861 漩涡振荡器,江苏海门市麒麟医用仪器厂; 高速冷冻离心机,美国 Thermo 公司等。

### 1.3 试验方法

#### 1.3.1 枯草芽孢杆菌对混菌发酵体系的影响

种子液的制备:将枯草芽孢杆菌 *Bacillus subtilis* A1 在 37 °C 无菌培养箱培养 2 d,再用无菌水洗脱,并用无菌水稀释至 OD<sub>600</sub>=1 的菌悬液待用。

小麦固态发酵培养基的制备:称取 1 000 g 小麦 (小麦水分含量约为 10%),加 5% (m/m) 的水润粮 4 h,再粉碎至烂皮不烂心。称取 240 g 粉碎好的小麦装入已灭菌的 4 个瓷盘中。设置实验组与对照组,加水量为 60 mL 的设为对照组,加种子液 30 mL 的设为实验组,再在每个实验与对照组中添加 30 mL 无菌水,将发酵系统的含水量调节到 40% 左右,搅拌均匀后用 8 层纱布密封。

实验所取的温度/湿度条件是根据浓香型大曲在生产过程中各阶段的发酵条件所设定的。以发酵温度、湿度为 25 °C、95%, 35 °C、85%, 43 °C、70%, 50 °C、60%, 58 °C、40%, 分别进行 5 组生料发酵。每个条件下设 3 个空白组 DQ、3 个实验组 CH,生料发酵 48 h,计算所用为 3 组平均值。

#### 1.3.2 总 DNA 提取和测序

DNA 的提取采用改良的 CTAB 法<sup>[10,11]</sup>。利用 Illumina 公司的 NovaSeq PE250 平台对细菌和真菌序列进行测序分析 (上海美吉生物医药科技有限公司),原始数据上传至 NCBI SRA 数据库。

#### 1.3.3 风味代谢物组分析

采用顶空固相微萃取-气相色谱-质谱联用技术 (HS-SPME-GC-MS) 对大曲挥发性成分进行了提取和分析<sup>[12]</sup>。在 20 mL 顶空瓶中加入 2 g 大曲样品、1 g NaCl。加入标准品 20 μL 0.022 64 mg/mL 乙酸正戊酯

为内标。平衡温度和萃取温度都是 60 °C,平衡 10 min, 萃取 50 min, 解析 3.5 min。仪器条件: 色谱条件: DB-WAX 毛细管色谱柱 (60 m×0.25 mm×0.25 μm); 载气: 氦气 (He); 流量: 1 mL/min, 不分流, 进样口温度 250 °C; 柱温: 起始温度 40 °C 保持 1 min, 以 5 °C/min 升温至 180 °C 保持 5 min, 再以 8 °C/min 升温至 230 °C 保持 10 min, 运行时间 50.25 min。质谱条件: 接口温度 250 °C, 离子源温度 230 °C, 电离方式为电子电离 (Electron Ionization, EI) 源, 电子能量 70 eV, 四级杆温度 150 °C, 传输线温度 290 °C, 扫描质量范围 20~550 u。

### 1.3.4 数据分析

与 NCBI 的 GenBank 进行 BLAST 比对, 确定细菌、真菌序列的分类信息, 获得属水平下的菌种种类及相对丰度<sup>[13]</sup>。LEFSe 分析: 基于 R 语言计算样本之间的差异性。PLS-DA 分析: 采用 SIMCA 14.1 计算所选样本之间的差异性。相关性网络分析: 采用 SPSS 20.0 计算所选 OTU 之间的 Spearman 相关系数 ( $\rho$ ), 选择 $|\rho|>0.6$  的相关微生物利用 Cytoscape 3.5.1 构建相关网络。

## 2 结果与讨论

### 2.1 枯草芽孢杆菌对混菌发酵体系微生物群落结构的影响

#### 2.1.1 混菌发酵体系微生物菌群结构分析

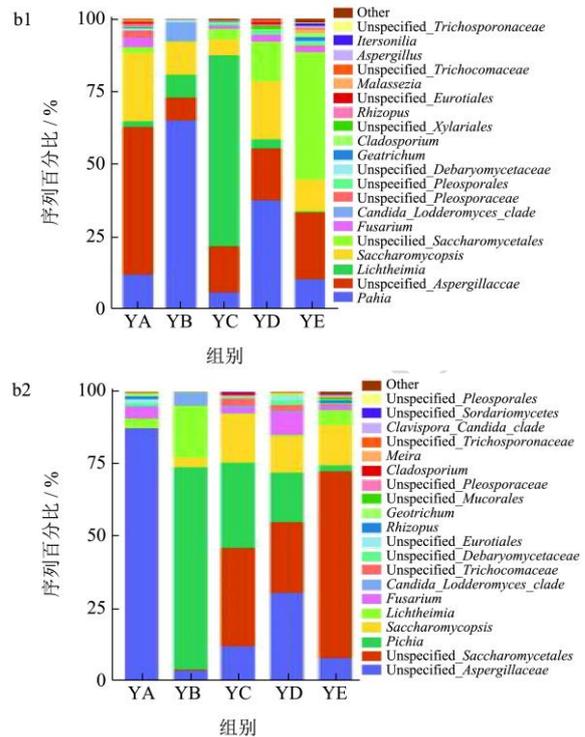
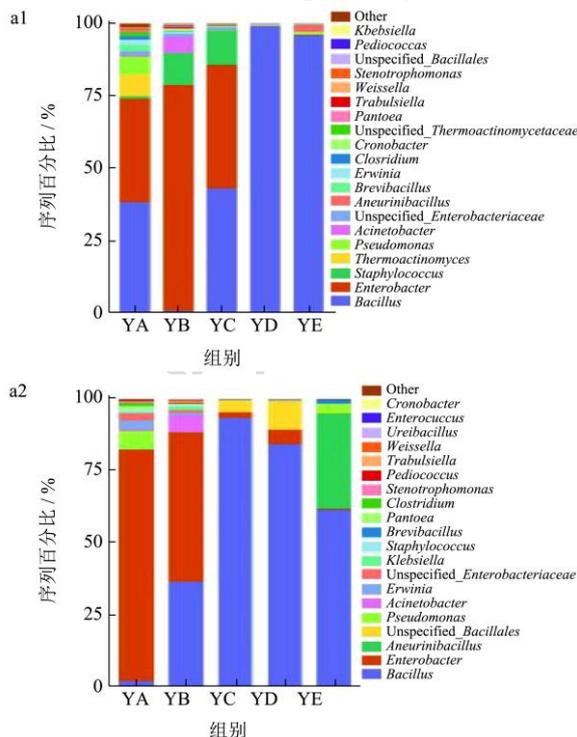


图 1 接种枯草芽孢杆菌前后属水平的物种组成

Fig.1 Species composition of genus level before and after *Bacillus subtilis* disturbance

注: a1: 未接种枯草芽孢杆菌; a2: 接种枯草芽孢杆菌; b1: 未接种枯草芽孢杆菌; b2: 接种枯草芽孢杆菌。YA-发酵温度、湿度为 25 °C、95%微生物组成; YB-发酵温度、湿度为 35 °C、85%微生物组成; YC-发酵温度、湿度为 43 °C、70%微生物组成; YD-发酵温度、湿度为 50 °C、60%微生物组成; YE-发酵温度、湿度为 58 °C、40%微生物组成。a-不同培养条件下细菌的物种组成; b-不同培养条件下真菌的物种组成。

接种 *Bacillus subtilis* A1 后, 通过 Illumina MiSeq 测序技术对空白组与实验组的细菌和真菌物种进行分析, 得到属水平上的物种组成情况, 结果如图 1 所示。属水平上, 将相对丰度低于 1% 的合并为一类 (Others), 在不同培养条件下, 细菌空白组最多检测到 31 个属, 细菌实验组最多检测到 40 个属。真菌空白组最多检测到 40 个属, 真菌实验组最多检测到 28 个属。在接种枯草芽孢杆菌后, 真菌的数量下降, 这可能是枯草芽孢杆菌与其他真菌在微生物体系中存在竞争关系有关。在整个过程选取的丰度大于 50% 的细菌菌属中, 在培养条件培养温度、湿度为 25 °C、95% 中丰度变化最大菌属分别为芽孢杆菌属 (*Bacillus*) 从 76.56% 降为 0.04%、肠杆菌属 (*Enterobacter*) 从 0.01% 上升为 71.53%、未知酵母菌属 (Unspecified-Saccharomycetales) 从 3.99% 降为 0.09%、未知曲霉菌科 (Unspecified\_Aspergillaceae) 从 23.28% 上升为 78.35%、复膜孢酵母属 (*Saccharomycopsis*) 从 46.95% 降为 0.06%, 培养温

度、湿度为 43 °C、70% 中丰度变化最大菌属分别为芽孢杆菌属(*Bacillus*)从接种前 16.78% 升为 69.23%、葡萄球菌属(*Staphylococcus*)从 23.10% 降为 0.93%，培养温度、湿度为 50 °C、60% 中丰度变化最大菌属分别为未知曲霉菌属(*Unspecified\_Aspergillaceae*)从 3.99% 升为 31.62%、横梗霉属(*Lichtheimia*)从 0.03% 升为 6.22%、毕赤酵母属(*Pichia*)从 62.17% 降为 12.89%，培养温度、湿度为 58 °C、40% 中丰度变化最大菌属分别为未知酵母菌属(*Unspecified\_Saccharomycetales*)从 8.60% 升为 78.65%、未知曲霉菌属(*Unspecified\_Aspergillaceae*)从 39.41% 降为 6.44%。

复杂的微生物群落对其他物种的入侵具有一定的抵御能力-系统鲁棒性，由于鲁棒性的存在微生物群落结构面对外源物种扰动时不会发生太大的改变，只会发生微小的变化<sup>[14]</sup>。在接种 *Bacillus subtilis* A1 后，细菌种类增加，真菌种类减少，且微生物丰度有较大的变化，这可能是 *Bacillus subtilis* A1 与群落中其他微生物发生相互作用打破了这种鲁棒性，使菌落种数和相对丰度有着较大的变化。这与王群<sup>[15]</sup>的研究相似，将分离自大曲的枯草芽孢杆菌用于芝麻香型白酒生产中，微生物的群落结构发生了改变。

### 2.1.2 不同培养条件下差异微生物分析

对接种前后不同阶段微生物进行 PCA 聚类分析。如图 2 所示， $P < 0.05$  说明接种前后微生物群落有显著差异，而且培养温度、湿度为 25 °C、95%，35 °C、85%，43 °C、70%，50 °C、60% 时空白组与实验组差异极为显著，培养温度、湿度为 58 °C、40% 时差异较小，说明接种后微生物群落结构有显著差异。

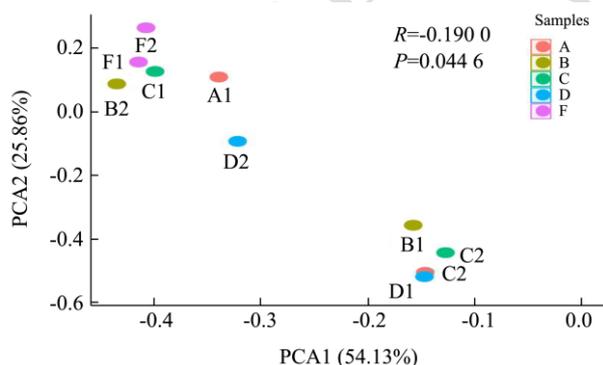


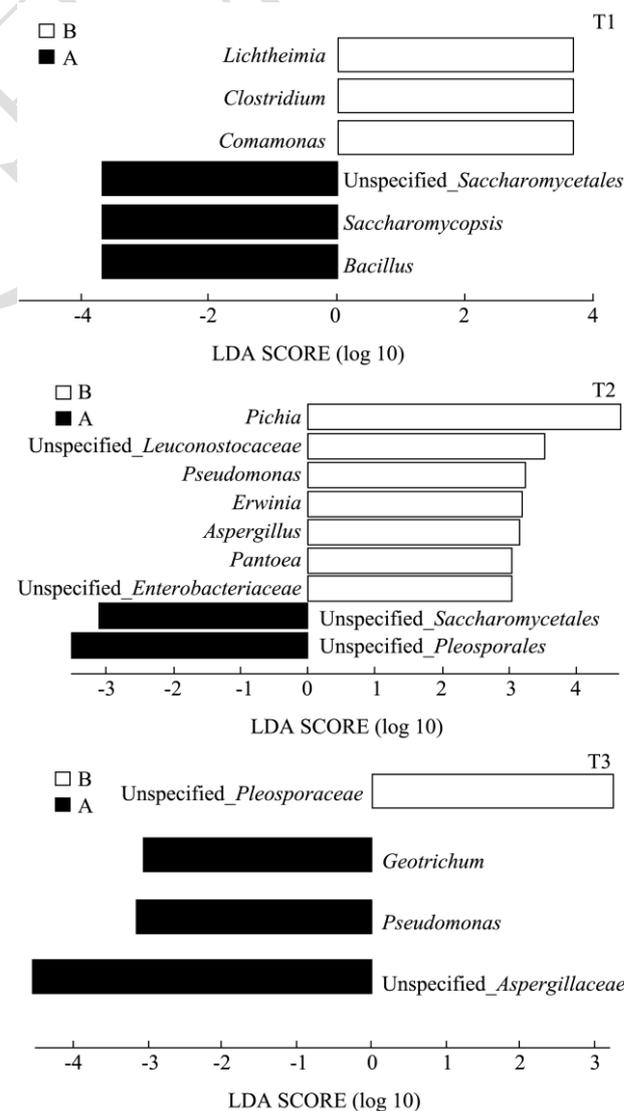
图 2 接种前后微生物聚类分析

Fig.2 Microbial cluster analysis before and after inoculation

注：A：培养温度、湿度为 25 °C、95%；B：培养温度、湿度为 35 °C、85%；C：培养温度、湿度为 43 °C、70%；D：培养温度、湿度为 50 °C、60%；F：培养温度、湿度为 58 °C、40%。  
1：接种前；2：接种后。

使用 LEFSE 分析对接种枯草芽孢杆菌 *Bacillus subtilis* A1 前后不同培养条件下微生物菌群进行差异分

析，其中 A 为空白组，B 为实验组，筛选条件为 LDA score 过滤阈值  $> 3$ ，Kruskal-Wallis 检验过滤阈值  $> 0.05$ ，结果如图 3。在接种枯草芽孢杆菌后随着培养条件的变化（即温度、湿度 25 °C、95%，35 °C、85%，43 °C、70%，50 °C、60%，58 °C、40%），枯草芽孢杆菌对微生物群落体系的也有着不同的影响，接种 *Bacillus subtilis* A1 前后毕赤酵母属(*Pichia*)是温度、湿度为 35 °C、85% 和 50 °C、60% 的显著差异微生物，未知明串珠藻科(*Unspecified\_Leuconostocaceae*)是温度、湿度为 43 °C、70% 和 58 °C、40% 的显著差异微生物，芽孢杆菌属(*Bacillus*)在温度、湿度为 25 °C、95% 的显著差异微生物。而在温度、湿度为 35 °C、85% 时，接种枯草芽孢杆菌后差异微生物数量最多，由此可知，在接种枯草芽孢杆菌后，微生物群落结构在不同培养条件下有着不同的变化。有研究表明，由于微生物的共存，发酵培养基中的挥发性化合物的代谢情况会发生一定的变化<sup>[15]</sup>，由此可以预测，在微生物改变后，在培养温度、湿度为 35 °C、85% 时对代谢产物的影响最大。



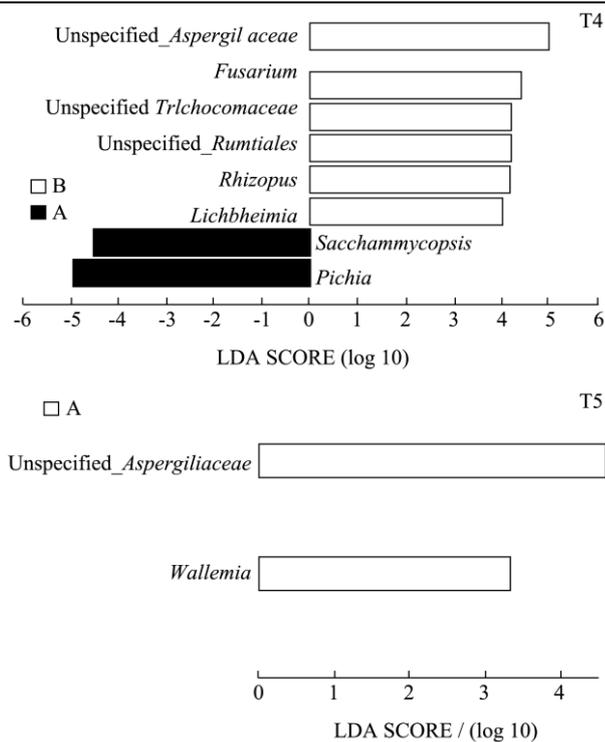


图3 基于 LEfSe 分析的差异微生物

Fig.3 Differential microorganisms based on lefse analysis

注: T1: 温度、湿度为 25 °C、95%时接种枯草芽孢杆菌 *Bacillus subtilis* A1 前后差异微生物; T2: 温度、湿度为 35 °C、85%时接种枯草芽孢杆菌 *Bacillus subtilis* A1 前后差异微生物; T3: 温度、湿度为 43 °C、70%时接种枯草芽孢杆菌 *Bacillus subtilis* A1 前后差异微生物; T4: 温度、湿度为 50 °C、60%时接种枯草芽孢杆菌 *Bacillus subtilis* A1 前后差异微生物; T5: 温度、湿度为 58 °C、40%时接种枯草芽孢杆菌 *Bacillus subtilis* A1 前后差异微生物。A: 空白组; B: 实验组。

## 2.2 枯草芽孢杆菌对发酵体系挥发性代谢产物合成的影响

### 2.2.1 挥发性代谢物成分分析

采用 HS-SPME-GC-MS 技术对不同培养条件下微生物代谢情况进行分析, 结果如图 3, 揭示了接种枯草芽孢杆菌 *Bacillus subtilis* A1 后对发酵体系微生物合成挥发性风味物质的组成以及相对含量有影响。在不同培养条件下, 空白组在发酵温度、湿度为 25 °C、95%时检出的挥发性化合物最多为 54 种, 而实验组在发酵温度、湿度为 35 °C、85%时检出的挥发性化合物最多为 66 种。

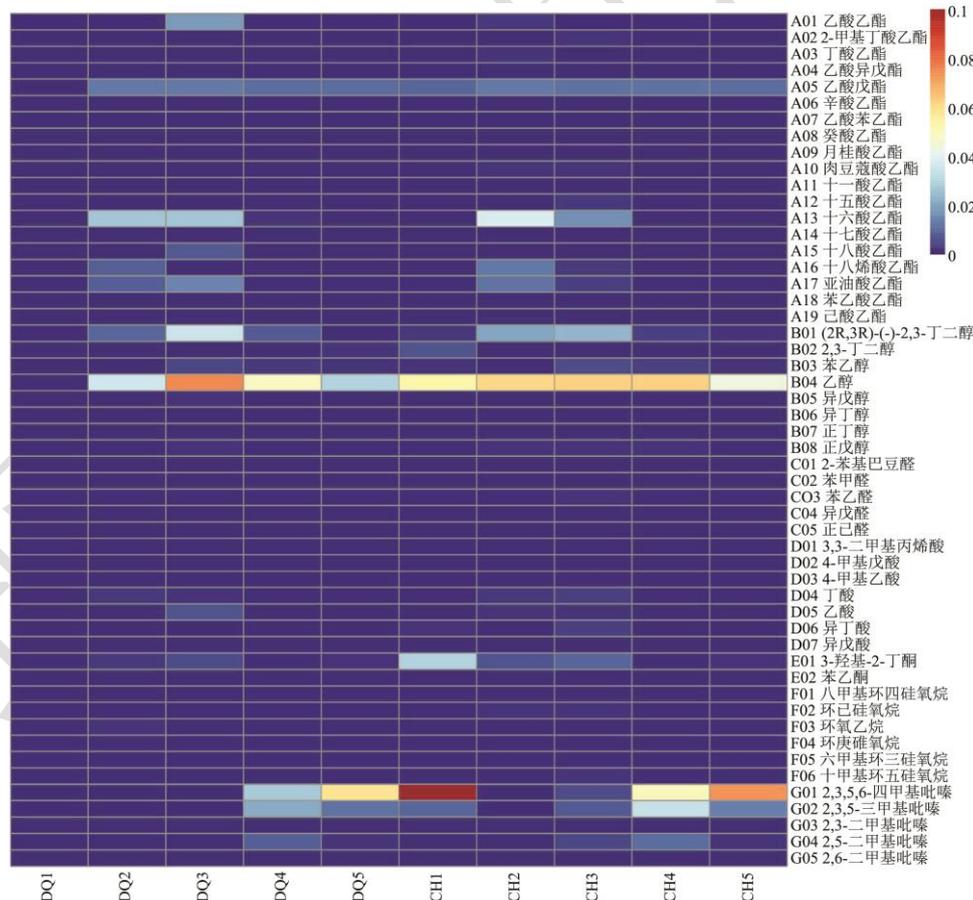


图4 不同培养条件下接种枯草芽孢杆菌 *Bacillus subtilis* A1 前后挥发性风味物质相对含量

Fig.4 Relative content of volatile flavor compounds before and after inoculation with *Bacillus subtilis* A1 under different culture conditions

注: DQ 为空白组; CH 为实验组。

通过对比不同培养条件下代谢物分组中的各物质的相对丰度(图4),可以看出,空白组与实验组酯类物质相对含量在温度、湿度为25℃、95%最高,醇类物质相对含量在温度、湿度为35℃、85%最高,醛类物质和酸类物质相对含量温度、湿度为43℃、70%时最高。但烷类物质含量空白组在温度、湿度35℃、85%最高,实验组在温度、湿度为25℃、95%最高。虽然接种枯草芽孢杆菌后总体酯类风味物质相对含量下降,但乙酸乙酯、丁酸乙酯、己酸乙酯的相对含量均有所提高,这与Li等<sup>[16]</sup>的结果一致,接种芽孢杆菌后,某些酯类物质相对含量有所上升,这与微生物丰度变化有关。醇类中乙醇、丁醇、戊醇的相对含量有所提高,同时苯乙醇占比增加,有助提高白酒中花香及蜂蜜香味<sup>[17]</sup>。实验组与空白组相比,醛类物质相对含量有所降低,在培养温度、湿度为35℃、85%时只有实验组中存在苯甲醛、苯乙醛。接种后总体酸类风味物质相对含量上升,其中3,3-二甲基丙烯酸、4-甲基戊酸、4-甲基乙酸为接种后独有。酮类物质是醛类形成的前体物质,醛可被还原生成醇和酯等化合物<sup>[18]</sup>,接种枯草芽孢杆菌后酮类物质相对含量下降,苯乙酮、3-羟基-2-丁酮是接种前后共有的酮类物质,且3-羟基-2-丁酮含量较高。接种枯草芽孢杆菌后烷类化合物有所上升,八甲基环四硅氧烷、环己硅氧烷、六甲基环三硅氧烷、十甲基环五硅氧烷、环庚硅氧烷是两者共有的物质。在吡嗪类化合物中,四甲基吡嗪类物质相对含量含量上升,这与游勇<sup>[19]</sup>的研究相似,在模拟大曲制作工艺固态发酵中接种一株耐热产淀粉酶地衣芽孢杆菌后,四甲基吡嗪类物质的相对含量较不接种增加。由此可知,接种枯草芽孢杆菌后会影响到发酵体系挥发性代谢产物的合成。且由各培养条件下的风味变化规律可知,在接种枯草芽孢杆菌后,培养条件温度、湿度为35℃、85%中酯类与酮类物质变化由上升变为下降,烷类物质变化由下降变为上升。

### 2.2.2 风味差异分析

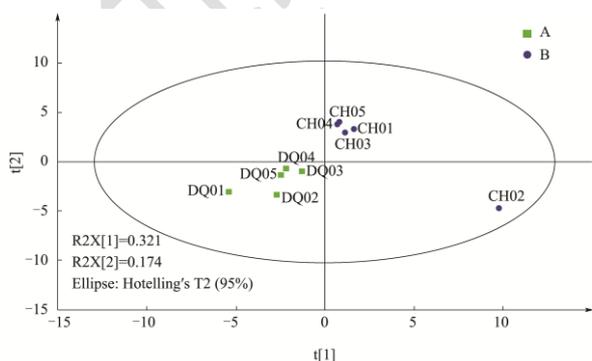


图5 主成分分析

Fig.5 principal component analysis

注: A 为空白组; B 为实验组。

表1 接种枯草芽孢杆菌 *Bacillus subtilis* A1 前后的发酵过程差异风味物质

Table 1 Different flavor substances in the fermentation process before and after inoculation with *Bacillus subtilis* A1

Var ID	VIP	Variance
环庚硅氧烷	1.824 72	1.723 64
环己硅氧烷	1.480 13	1.012 73
3-羟基-2-丁酮	1.386 24	1.735 52
异戊醇	1.255 44	1.837 54
乙酸异戊酯	1.194 1	1.966 76
乙酸苯乙酯	1.194 1	1.966 76
苯乙醇	1.1524 5	0.890 311
2,3,5,6-四甲基吡嗪	1.122 7	1.332 75
十八酸乙酯	1.1205 3	1.749 22
正己醛	1.093 93	0.706 707
十一酸乙酯	1.092 19	0.725 846
十七酸乙酯	1.092 19	0.725 846
己酸乙酯	1.092 19	0.725 846
异戊酸	1.092 19	0.725 846
苯乙酮	1.085 15	0.615 109
异丁酸	1.074 55	0.663 738
乙酸乙酯	1.073 41	1.668 59
乙酸戊酯	1.034 87	0.990 987
十八烯酸乙酯	1.025 36	0.644 189

表2 接种枯草芽孢杆菌 *Bacillus subtilis* A1 前后温度、湿度为35℃、85%差异风味物质

Table 2 Before and after inoculation with *Bacillus subtilis* A1, the temperature and humidity were 35℃ and 85% of different flavor substances

Var ID	VIP	Variance
己酸乙酯	1.293 13	0.071 245
十甲基环五硅氧烷	1.292 45	0.066 329
2,3,5,6-四甲基吡嗪	1.291 43	0.218 944
苯乙醛	1.283 42	0.062 704
亚油酸乙酯	1.282 87	0.064 542
乙酸乙酯	1.279 16	0.316 661
八甲基环四硅氧烷	1.273 43	0.149 611
3,3-二甲基丙烯酸	1.272 14	0.106 867
环己硅氧烷	1.269 63	0.276 982
异戊醇	1.275 95	0.332 055
2,3,5-三甲基吡嗪	1.257 56	0.335 842
乙酸	1.213 54	0.344 868
六甲基环三硅氧烷	1.208 96	0.311 124
苯甲醛	1.153 53	0.533 51
异丁酸	1.114 6	0.521 777
2-甲基丁酸乙酯	1.085 52	0.583 198
辛酸乙酯	1.007 28	0.679 478

同时满足基于 PLS-DA 模型的变量投影重要度 VIP >1、变量差异倍数 (fold change, FC) >1.5 或 FC<0.5 和 *t* 检验  $P \leq 0.05$  确定不同培养条件实验组与空白组的差异情况,结果如图 5 所示。接种前后风味结构有差异,且发酵温度、湿度为 43 °C、70%时,实验组与空白组微生物代谢情况差异最小,而发酵温度、湿度为 35 °C、85%时,实验组与空白组中微生物代谢情况差异最大。

对总培养过程中的空白组与实验组,进行 LEFSE 分析,探寻差异代谢物,结果如表 1 所示。发现在发酵过程中, VIP 值>1 的共有 19 个差异代谢物,己酸乙酯、2,3,5,6-四甲基吡嗪、异戊醇、乙酸乙酯、3-羟基-2-丁酮等都是显著差异代谢物。其中四甲基吡嗪不仅是白酒酿造中的特征香气物质,也是白酒中的健康因子,同时四甲基吡嗪的抗氧化活性使其在心血管疾病防治方面有重要意义<sup>[20]</sup>。己酸乙酯是己酸和酵母发

酵产生的酒精生成的,是浓香型白酒的主体香成分<sup>[21]</sup>,在接种了枯草杆菌代谢产生的芽孢杆菌后,枯草芽孢杆菌可能影响己酸菌和酵母菌的生命活动使己酸乙酯含量上升。同时枯草芽孢杆菌作为外来菌种加入发酵体系后,也会对其他菌种造成影响,从而影响菌种间的相互作用,造成代谢物的变化<sup>[22]</sup>。

而在对差异最大培养条件(即培养条件温度、湿度为 35 °C、85%)的空白组与实验组进行 LEFSE 分析,探寻差异代谢物,结果如表 1 所示。发现在该培养条件下,共有 17 种差异代谢产物,己酸乙酯、2,3,5,6-四甲基吡嗪、乙酸乙酯均是该培养条件下的显著性较大的差异代谢产物,说明在发酵过程中某些风味在某一阶段具有显著性变化,这与 Wang<sup>[23]</sup>的研究一致,在接种地衣芽孢杆菌后在强化后期吡嗪是强化组与未强化组差别最大的化合物。

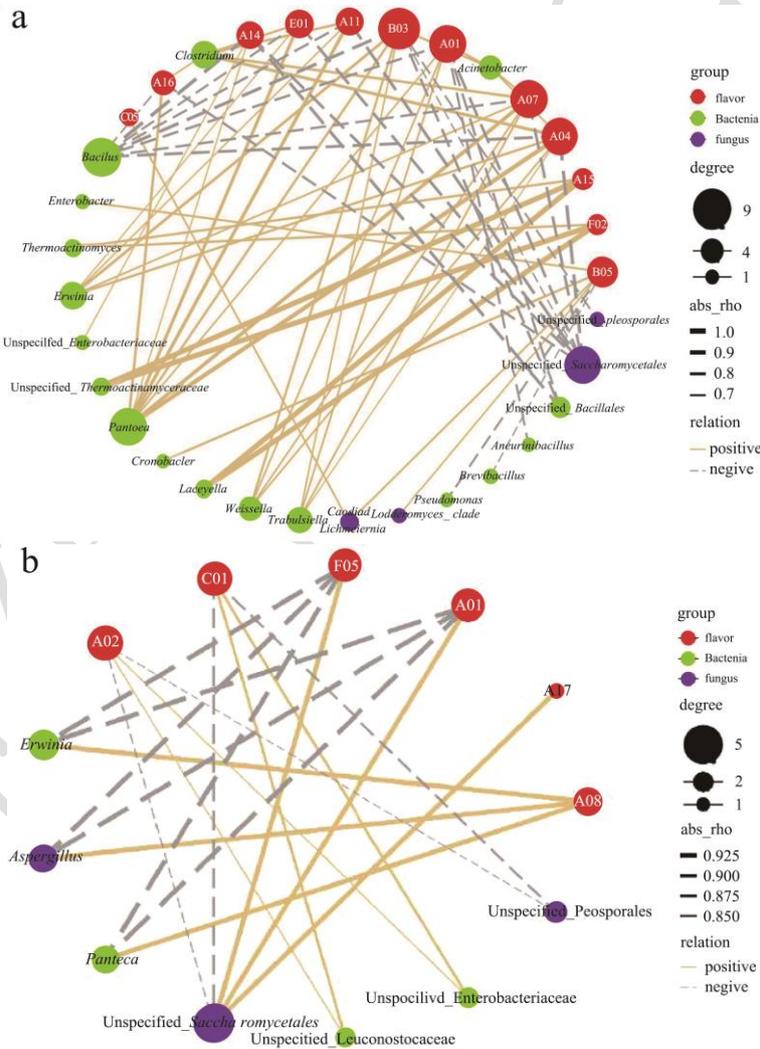


图 6 接种枯草芽孢杆菌前后差异微生物与差异代谢物相关性网络图

Fig.6 Correlation network of differential microorganisms and metabolites before and after inoculation with *Bacillus subtilis*

注: a: 接种枯草芽孢杆菌后前 20 真菌细菌与差异风味物质相关性分析; b: 接种枯草芽孢杆菌后培养温度、湿度为 35 °C、85% 时差异微生物与差异风味物质间相关性分析。

### 2.3 差异微生物与差异代谢物相关性分析

将相对丰度前 20 的细菌与真菌与整个过程差异风味物质进行相关性分析,探究风味物质产生差异的原因,结果图 6a 所示, *Bacillus* 和 *Unspecified\_Saccharomycetales* 与 8 种差异风味物质呈负相关关系, *Enterobacter*、*Unspecified\_Enterobacteriaceae*、*Cronobacter*、*Candida\_Lodderomyces\_clade* 等菌都只与 1 种差异风味物质呈正相关关系, *Pseudomonas*、*Brevibacillus*、*Aneurinibacillus*、*Unspecified\_Pleosporaceae* 等菌只与 1 种差异风味物质呈负相关关系, *Thermoactinomyces*、*Lichtheimia* 和 *Unspecified\_Thermoactinomycetaceae* 与 2 种差异风味物质呈正相关关系, *Erwinia* 和 *Clostridium* 与 5 种差异风味物质呈正相关关系, *Pantoea* 与 8 种差异风味物质呈正相关关系, *Laceyella* 与 2 种差异风味物质呈正相关关系, *Weissella*、*Trabulsiella* 和 *Acinetobacter* 与 4 种差异风味物质呈正相关关系, *Unspecified\_Bacillales* 与 3 种差异风味物质呈负相关关系。由此可知,在混菌固态发酵过程中,风味物质的改变与微生物的变化有关。

同时,由上述可知,当培养条件温度、湿度为 35℃、85%时,空白组与实验组中代谢产物与微生物有明显差异,将该培养条件下空白组与实验组的差异物种与差异代谢产物进行相关性网络分析,探寻对差异代谢产物具有影响的微生物,结果如图 6b 所示。接种枯草芽孢杆菌后,差异微生物对差异代谢物有着积极或消极的影响。满足  $P < 0.05$  的有 7 种微生物和 6 种代谢物,其中未知酵母(*Unspecified\_Saccharomycetales*)对这 6 种代谢产物均有影响。而未知明串珠藻科(*Unspecified\_Leuconostocaceae*)、未知肠杆菌科(*Unspecified\_Enterobacteriaceae*)和未知的格孢腔菌目(*Unspecified\_Pleosporales*)只对 2,3,5,6-四甲基吡嗪、乙酸乙酯有影响,说明这两个化合物的变化与这三种接种后有变化的菌属有关,这与王鹏<sup>[18]</sup>的研究相似,地衣芽孢杆菌强化大曲中吡嗪和芳香族化合物的增加与一些强化后显著增加的微生物有关。

### 3 结论

在这项研究中,接种枯草芽孢杆菌会显著的影响混菌发酵体系, *Bacillus*、*Enterobacter*、*Unspecified\_Saccharomycetales*、*Unspecified\_Aspergillaceae*、*Saccharomycopsis* 等菌属的相对丰度变化最为明显。且在代谢产物分析中,己酸乙酯、2,3,5,6-四甲基吡嗪、异戊醇、乙酸乙酯、3-羟基-2-丁酮等都是接种枯草芽孢杆菌后的显著差异代谢物。而由丰度较大的微生物

与显著差异风味物质的相关性分析可知,这些风味物质的变化可能是由微生物引起的。而在选取的 5 个培养条件下,温度、湿度为 35℃、85%下接种枯草芽孢杆菌会产生较多的差异微生物和差异代谢产物。同时经过对该培养条件下的差异物种与差异代谢物的相关性分析得出:在接种枯草芽孢杆菌后,显著差异代谢产物与差异微生物间存在着正相关或负相关的关系,说明代谢物的变化与微生物的变化有关。由此可知,接种枯草芽孢杆菌后,发酵条件的改变会产生不同的差异微生物,而这些差异微生物可能会导致某些代谢物产生变化。这表明了枯草芽孢杆菌在混菌发酵体系中会使菌落发生改变,可能导致相应代谢产物的改变,丰富了大曲的风味,为探明枯草芽孢杆菌在多菌共菌发酵体系中的作用提供基础数据。

### 参考文献

- [1] Gha B, Yi D C, Jha B, et al. Alteration of microbial community for improving flavor character of Daqu by inoculation with *Bacillus velezensis* and *Bacillus subtilis* - Science Direct [J]. LWT, 2019, 111: 1-8.
- [2] 谭崇尧,徐军.高通量测序法对不同地域浓香型大曲微生物结构的分析[J].酿酒科技,2018,9:118-122.
- [3] 高超,马翠卿,严金鑫,等.一种利用地衣芽孢杆菌工程菌株发酵生产乙偶姻的方法:CN109486871A[P]. 2019.
- [4] 肖梓军,顾如林,侯孝元,等.一株芽孢杆菌及其在高温发酵生产乙偶姻和 2,3-丁二醇中的应用:CN105820988A[P]. 2016.
- [5] Adachi T, Kamiya H, Kosuge T. Studies on the metabolic products of *Bacillus subtilis*. 3. Relation between amino acids and tetramethylpyrazine production [J]. Yakugaku Zasshi, 1964, 84: 543-545.
- [6] 黄晓宁,刘晶晶,韩北忠,等.基于酶学特性筛选大曲来源芽孢杆菌用于强化酿酒[J].食品科学,2021,42(10):218-224.
- [7] Li W W, Fan G S, Fu Z L, et al. Effects of fortification of Daqu with various yeasts on microbial community structure and flavor metabolism [J]. Food Research International, 2019, 129: 108837.
- [8] 袁庆云.酱香型白酒发酵过程中微生物的功能研究[J].酿酒, 2016,43(4):15-20.
- [9] 沈怡方.白酒生产技术全书[M].北京:中国轻工业出版社, 1998.
- [10] Williamson R C, Toye A M. Glycophorin A: Band 3 aid [J]. Blood Cells Molecules & Diseases, 2008, 41(1): 40-43.
- [11] 夏珂,罗惠波,周平等.不同处理方式的大曲真菌群落差异分析[J].食品科学,2018,39(22):166-172.

- [12] 王艳云,郭笃发.应用高通量测序技术研究怪柳、獐茅土壤真菌多样性[J].生物技术通报,2016,32(7):48-53.
- [13] 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): 64-71.
- [14] Burmølle M, Webb J S, Rao D, et al. Enhanced biofilm formation and increased resistance to antimicrobial agents and bacterial invasion are caused by synergistic interactions in multispecies biofilms [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2006, 72(6): 3916-3923.
- [15] 王群.芝麻香型白酒用枯草芽孢杆菌脱水菌剂研究[D].济南:齐鲁工业大学,2016.
- [16] 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* [J]. *Food Microbiology*, 2017, 61: 83-92.
- [17] Blanchard A E, Lu T. Bacterial social interactions drive the emergence of differential spatial colony structures [J]. *BMC Systems Biology*, 2015, 9(1): 59.
- [18] Fan W, Qian M C. Identification of aroma compounds in Chinese 'Yanghe Daqu' liquor by normal phase chromatography fractionation followed by gas chromatography[so]lfactometry [J]. *Flavour & Fragrance Journal*, 2010, 21(2): 333-342.
- [19] 游勇,吴晓玉,廖家富,等.特香型白酒大曲中一株耐热产淀粉酶地衣芽孢杆菌的分离和鉴定[J].酿酒科技,2022,3:17-24.
- [20] 范海燕,范文来,徐岩.应用 GC-O 和 GC-MS 研究豉香型白酒挥发性香气成分 [J]. *食品与发酵工业*, 2015,41(4): 147-152.
- [21] 苗志伟,刘玉平,孙宝国.东北特产香其酱中挥发性成分的 SPME-GC-MS 分析[J].*食品与发酵工业*,2011,37(10):139-144.
- [22] Adebo O A, Kayitesi E, Tugizimana F, et al. Differential metabolic signatures in naturally and lactic acid bacteria (LAB) fermented ting (a southern African food) with different tannin content, as revealed by gas chromatography mass spectrometry (GC-MS)-based metabolomics [J]. *Food Research International*, 2019, 121: 326-335.
- [23] 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.