

邯郸地区不同类型高温大曲细菌群落 与理化特性差异性分析

王玉荣^{1,2}, 侯强川^{1,2}, 田龙新², 张振东³, 黄利科³, 孔金钊³, 郝光飞⁴, 郭壮^{1,2*}

(1. 湖北文理学院湖北省食品配料工程技术研究中心, 湖北襄阳 441053) (2. 襄阳市酱香型白酒固态发酵企业联合创新中心, 酱香型白酒固态发酵襄阳市重点实验室, 湖北襄阳 441053) (3. 邯郸永不分梨酒业股份有限公司技术中心, 邯郸市白酒酿造生产工程研究中心, 河北临漳 056600) (4. 河北工程大学生命科学与食品工程学院, 河北邯郸 056038)

摘要: 该研究采用高通量测序技术对不同类型高温大曲细菌群落进行了解析, 继而对其理化指标进行测定, 同时对2者的相关性进行分析, 最后使用纯培养技术对细菌资源进行挖掘。测序结果表明, 黄色高温大曲中 *Thermoactinomyces*、*Limosilactobacillus* 和 *Weissella* 的平均相对含量显著偏高 ($P<0.05$), 分别为 21.04%、14.30% 和 3.15%, *Lentibacillus* 和 *Kroppenstedtia* 的平均相对含量显著偏低 ($P<0.05$), 分别为 3.30% 和 2.81%, 而其在黑色高温大曲中分别为 1.93%、0.036%、0.027%、34.45% 和 20.75%。此外, LEfSe 分析发现 *Thermoactinomyces* 和 *Lentibacillus* 可分别作为黄色和黑色高温大曲的生物标志物。理化指标测定显示, 黄色高温大曲的水分含量、液化力、糖化力、酯化力和酒化力显著偏高 ($P<0.05$), 而酸度显著偏低 ($P<0.05$)。相关性分析发现, 优势细菌属与理化指标之间存在显著相关性 ($P<0.05$)。采用纯培养技术从高温大曲样品中共分离得到 33 株细菌菌株, 鉴定为 5 个属的 10 个种, 主要以 *Bacillus* 为主, 且 *B. licheniformis* 为优势分离株, 占分离株总数的 30.30%。由此可见, 2 种类型高温大曲细菌群落与理化指标间均存在明显差异, 且微生物与理化指标之间具有一定相关性。

关键词: 高温大曲; 细菌群落结构; 理化指标; 分离鉴定

文章编号: 1673-9078(2024)10-136-145

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2024.10.1024

Analysis of Differences in Bacterial Community Structure and Physicochemical Indices between Yellow and Black High-temperature Daqu Produced in Handan

WANG Yurong^{1,2}, HOU Qiangchuan^{1,2}, TIAN Longxin², ZHANG Zhendong³, HUANG Like³,
KONG Jinzhao³, HAO Guangfei⁴, GUO Zhuang^{1,2*}

引文格式:

王玉荣,侯强川,田龙新,等.邯郸地区不同类型高温大曲细菌群落与理化特性差异性分析[J].现代食品科技,2024,40(10):136-145.

WANG Yurong, HOU Qiangchuan, TIAN Longxin, et al. Analysis of differences in bacterial community structure and physicochemical indices between yellow and black high-temperature daqu produced in Handan [J]. Modern Food Science and Technology, 2024, 40(10): 136-145.

收稿日期: 2023-08-29

基金项目: 湖北省自然科学基金计划襄阳创新发展联合基金项目 (2023AFD049; 2023AFB288); 邯郸市科学技术研究与发展计划项目 (21212906064); 湖北文理学院教师科研能力培育基金“科技创新团队”(2020kypytd009)

作者简介: 王玉荣 (1993-), 女, 博士, 讲师, 研究方向: 食品微生物与生物技术, E-mail: wangyurong1993@163.com

通讯作者: 郭壮 (1984-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 食品生物技术, E-mail: guozhuang@vip.163.com

(1. Hubei Provincial Engineering and Technology Research Center for Food Ingredients, Hubei University of Arts and Science, Xiangyang 441053, China) (2. Xiangyang Jiangxiang Baijiu Solid State Fermentation Enterprise-School Joint Innovation Center, Xiangyang Key Laboratory of Solid State Fermentation of Jiangxiang Baijiu, Xiangyang, 441053, China) (3. Technical Center of Handan Yongbufenli Co. Ltd., Handan Baijiu Brewing and Production Engineering Research Center, Linzhang, 056600 China) (4. School of Life Sciences and Food Engineering, Hebei University of Engineering, Handan, 056038, China)

Abstract: Illumina MiSeq high-throughput sequencing was used to analyze the differences in bacterial community structure between yellow and black high-temperature Daqu. Subsequently, the physicochemical indices of Daqu samples were measured, and the correlations between bacterial community structure and physicochemical indices were analyzed. Finally, the pure culture technique was used to explore the bacterial populations present in the Daqu samples. The sequencing results showed that the average relative abundances of *Thermoactinomyces* (21.04%), *Limosilactobacillus* (14.30%), and *Weissella* (3.15%) in the yellow high-temperature Daqu were significantly higher ($P<0.05$) than those (1.93%, 0.036%, and 0.027%, respectively) in the black high-temperature Daqu, whereas the average relative abundances of *Lentibacillus* (3.30%) and *Kroppenstedtia* (2.81%) in the yellow high-temperature Daqu were significantly lower ($P<0.05$) than those (34.45% and 20.75%, respectively) in the black high-temperature Daqu. In addition, LEfSe analysis showed that *Thermoactinomyces* and *Lentibacillus* could be used as biomarkers for yellow and black high-temperature Daqu, respectively. The measurement results of physicochemical indices showed that compared to the black high-temperature Daqu, the yellow high-temperature Daqu exhibited significantly higher water content, liquefaction power, saccharification power, esterification power, and alcoholic power ($P<0.05$), and significantly lower acidity ($P<0.05$). Correlation analysis revealed significant correlations between the dominant bacterial genera and physicochemical indices in the two types of high-temperature Daqu ($P<0.05$). A total of 33 bacterial strains were isolated from high-temperature Daqu samples using the pure culture technique. The strains comprised ten species under five genera, with *Bacillus* being the dominant genus and *B. licheniformis* being the dominant isolate (accounting for 30.30% of the total number of isolates). Hence, the two types of high-temperature Daqu exhibited significant differences in bacterial community structure and physicochemical indices, and their bacterial community structures were correlated with their physicochemical indices.

Key words: high-temperature Daqu; bacterial community structure; physicochemical indices; isolation and identification

作为酱香型白酒酿造的主要原料^[1], 高温大曲是以小麦为主要原料, 经高温发酵而制成^[2]。在制曲过程中, 由于曲块在发酵仓摆放位置的不同, 温度、氧浓度和水分等会存在差异^[3], 使得成品曲呈现出不同颜色。当前期升温较快且后期干燥不充分, 曲块最终会呈现黑色, 主要位于曲堆的中间层, 但当前期升温适中, 后期干燥情况良好时则呈现为黄色, 主要均匀分布在曲堆中间或者下层, 但部分酒厂还会在靠近门窗的位置出现白色大曲, 主要是因为前期发酵温度较低且后期干燥较差。目前, 已有许多研究人员从微生物群落结构和理化特性等方面对黄色和黑色的高温大曲进行了研究, 例如 Deng 等^[4]对采集自四川省泸州市的高温大曲研究发现, 不同类型高温大曲的细菌群落结构存在显著差异 ($P<0.05$), 克罗彭斯特菌属 (*Kroppenstedtia*) 在黄色高温大曲中显著富集 ($P<0.05$), 其在黄色和

黑色高温大曲中平均相对含量分别为 87% 和 0.8%。王颖等^[5]对取自赤水河产区的高温大曲研究发现, 不同类型高温大曲的理化性质之间均存在差异, 其中黑曲的酸度最高, 黄曲的氨基酸态氮水平最高。由此可见, 黄色和黑色高温大曲在细菌群落结构和理化指标上均存在明显差异。

近年来, Illumina MiSeq 高通量测序技术突破了传统微生物纯培养方法的限制^[6], 已被广泛应用于大曲微生物群落结构的研究中。例如 Tian 等^[7]采用高通量测序技术对十里香白酒大曲研究发现, 厚壁菌门 (Firmicutes) 为优势细菌门, 所有大曲样本中其平均相对含量均大于 75.4%, 乳杆菌属 (*Lactobacillus*) 为优势细菌属, 平均相对含量为 33.8%。杜艳红等^[8]采用高通量测序技术对北京红星 4 种类型大曲样品细菌多样性研究发现, 克罗彭斯特菌属 (*Kroppenstedtia*, 34.16%)、链霉菌属

(*Streptomyces*, 21.52%) 和芽孢杆菌属 (*Bacillus*, 13.06%) 为大曲样品的优势细菌属。此外,高通量测序技术不仅能够对优势菌群进行挖掘,还能够检测到那些很难通过纯培养技术发现的和在样品中丰度较低的微生物,从而全面揭示样品中微生物的菌群结构,为探索不同类型高温大曲微生物群落差异提供新的研究工具。

作为酱香型白酒的新产区之一,河北省邯郸市属于温带大陆性季风气候,给微生物的生长提供了适合的条件。然而目前对于高温大曲的研究大多数集中于长江上游超级产区,而黄河中上游产区尤其是邯郸地区的研究还尚少。因此本研究采用 Illumina MiSeq 高通量测序技术对采集自河北省邯郸市某酒业的 4 个黄色和 6 个黑色共计 10 个高温大曲样品的细菌群落结构进行解析,其次对其理化指标进行了测定,同时对 2 种类型高温大曲间的差异和优势细菌属与理化指标之间的相关性进行了探究,最后通过传统纯培养技术对高温大曲中细菌菌株进行保藏。本研究的开展以期解析不同类型高温大曲的差异提供数据支持,为强化大曲的开发研究提供菌株支撑。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

高温大曲河北省邯郸市永不分梨酒业(36°20'~36°44'N, 114°03'~114°40'E)提供,从曲堆不同位置随机选取黄色高温大曲 4 块,编号为 Y1~Y4,黑色高温大曲 6 块,编号为 B1~B6,2 种颜色的高温大曲于同一批次进行生产,且所使用的原材料和生产工艺也完全一致。将采集的高温大曲样品进行粉碎,过 40 目筛后使用四分法混合均匀取样,保存于 -20 °C 备用。

氢氧化钠、浓盐酸、浓硫酸、葡萄糖、可溶性淀粉、碘、碘化钾、无水乙酸钠、乙酸、乙醇、甲醛(均为分析纯),国药集团化学试剂有限公司;DNeasy mericon Food Kit DNA 基因组提取试剂盒,德国 QIAGEN 公司;10×Buffer、DNA 聚合酶和脱氧核糖核苷三磷酸(deoxy-ribonucleoside triphosphate, dNTP)、rTaq 酶,北京全式金生物技术有限公司;引物 338F/806R、27F/1495R 和 M13F (-47)/M13R (-48),上海桑尼生物科技有限公司。

1.2 仪器与设备

AND 日本 MS-70 快速水分测定仪,上海右一仪器有限公司;AW-1 水分活度仪,无锡碧波电子设备厂;K1100 凯氏定氮仪,海能未来技术集团股份有限公司;ECLIPSE Ci 生物显微镜,日本 Nikon 公司;Veriti FAST 梯度 PCR 仪,美国 ABI 公司;UVPCDS8000 凝胶成像分析系统,美国 Protein Simple 公司;Illumina MiSeq PE300 高通量测序平台,美国 Illumina 公司;R930 机架式服务器,美国 DELL 公司。

1.3 实验方法

1.3.1 两种类型高温大曲理化指标的测定

水分含量使用快速水分测定仪进行测定,水分活度使用水分活度仪进行测定,酸度、淀粉含量、发酵力、液化力、糖化力、酯化力、酒化力、灰分和氨基酸态氮参照 QB/T 4257-2011《酿酒大曲通用分析方法》^[9]规范的方法进行测定,蛋白质含量参照 GB 5009.5-2016《食品中蛋白质的测定》^[10]规范的方法进行测定。

1.3.2 两种类型高温大曲基因组 DNA 提取及 Illumina MiSeq 测序

对 2 种类型高温大曲各样本的总 DNA 使用 QIAGEN DNeasy mericon Food Kit DNA 基因组提取试剂盒进行提取,使用 1 wt.% 琼脂糖凝胶电泳对提取的样本 DNA 进行检测。使用正反向引物 338F/806R (338F: 5'-ACTCCTACGGGAGGCAGCAG-3' 和 806R: 5'-GGACTACHVGGGTWTCTAAT-3') 参照 Chen 等^[11]的方法对检测合格 DNA 的细菌 16S rRNA V₃-V₄ 区基因序列进行聚合酶链式反应(Polymerase chain reaction, PCR)扩增,将经过 1.5 wt.% 琼脂糖凝胶电泳检测合格的扩增产物,寄到上海美吉生物医药有限公司进行高通量测序。

1.3.3 生物信息学分析

参照 Hu 等^[12]的方法使用 FLASH 软件对序列进行拼接,使用 UCHIME 将嵌合体过滤后^[13],通过 Usearch 在 97% 的相似性水平下进行分类操作单元矩阵(Operational Taxonomic Units, OTU)的划分^[14],选取代表性序列后,通过 SILVA 数据库^[15]在门属水平上注释细菌群落的系统发育信息,并在此基础上进行细菌群落的 α 多样性和 β 多样性分析。所有软件的调用均基于 QIIME (Quantitative Insights Into Microbial Ecology) 平台^[16]。

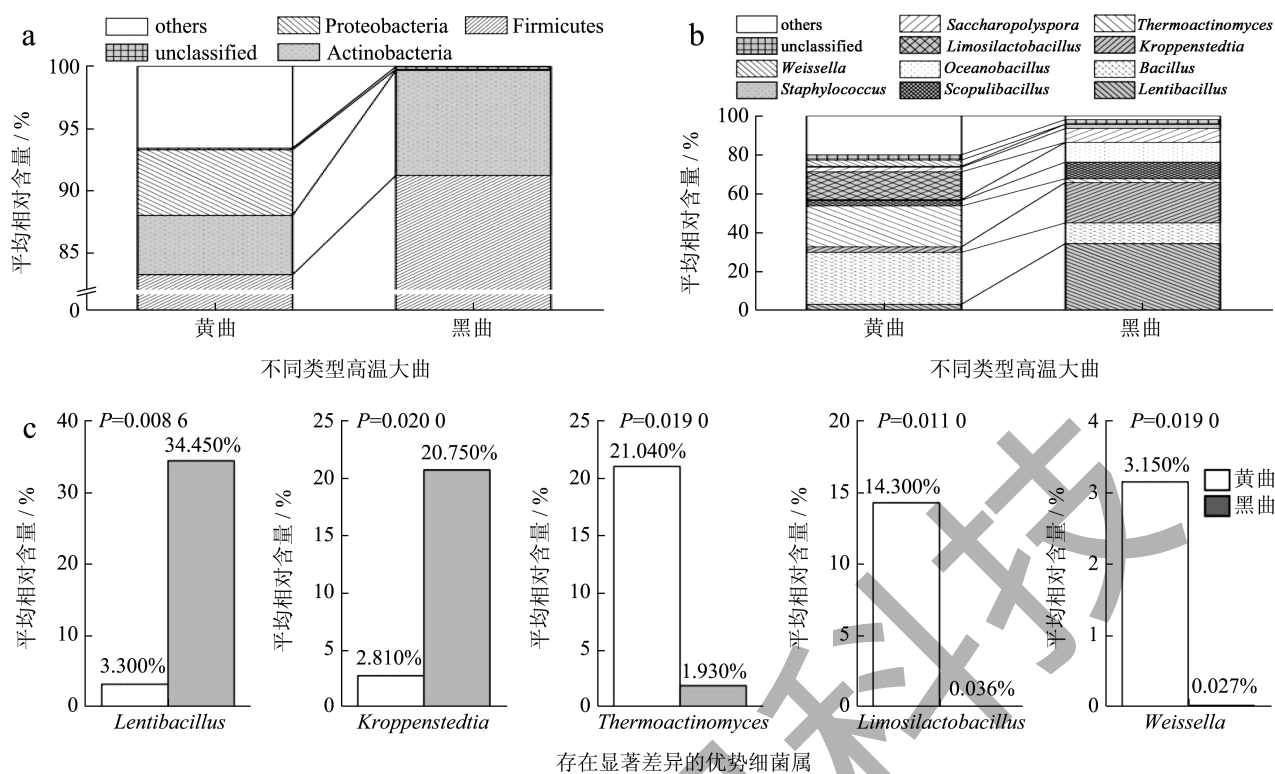


图1 黄色和黑色高温大曲优势细菌门和属相对含量比较分析

Fig.1 Comparative analysis of dominant bacteria phyla and genera of yellow and black high-temperature Daqu

注：(a) 优势细菌门平均相对含量柱形图；(b) 优势细菌属平均相对含量柱形图；(c) 存在显著性差异优势细菌属平均相对含量柱形图。

1.3.4 两种类型高温大曲中细菌菌株的分离鉴定

准确称取 10 g 高温大曲粉末样品于装有 90 mL 生理盐水的锥形瓶中，37 °C 震荡混匀 30 min，进行 10 倍稀释，选取 10^{-4} 、 10^{-5} 和 10^{-6} 这 3 个梯度的稀释液于 NA 固体培养基上进行涂布，37 °C 培养 48 h，3 次纯化后将镜检结果合格的菌株使用甘油管藏法保存于 -80 °C 备用。对分离株的 DNA 进行提取，将经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测合格的 DNA 使用正反向引物 27F 和 1495R (27F: 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3' 和 1495R: 5'-CTACGGCTACCTTG-3') 进行 PCR 扩增、连接和转化^[17]，将阳性克隆子送往上海桑尼生物科技有限公司进行测序。将返回序列拼接去除引物后在美国国立生物技术信息中心 (National Center for Biotechnology Information, NCBI) 网站进行相似性比对，然后与模式菌株进行系统发育树的构建。

1.3.5 数据处理

使用 Origin 2018 软件绘制柱形图；使用 R (v4.1.3) 软件绘制 PCoA 图和普氏分析图；使用在线网站 (<http://huttenhower.sph.harvard.edu/galaxy/>) 绘制 LefSe 图；使用 Cytoscape 软件绘制相关性网络

图；使用 Past3 软件中的 Mann-Whitney 检验法进行优势细菌门、优势细菌属和理化指标之间的差异性分析；使用 MEGA7.0 和 R 软件进行系统发育树的构建。

2 结果与分析

2.1 两种类型高温大曲细菌群落结构分析

十份高温大曲样品经 MiSeq 高通量测序后共得到 405 568 条高质量序列，划分为 4 289 个 OTU，归属于 37 个门，78 个纲，113 个目，237 个科和 506 个属，将平均相对含量 > 1.0% 的门和属定义为优势细菌门和属，其在 2 种类型高温大曲中的组成如图 1 所示。

由图 1a 可知，从 10 份高温大曲样本中共检测到 3 个优势细菌门，分别为 Firmicutes (88.01%)、放线菌门 (Actinobacteria, 6.99%) 和变形菌门 (Proteobacteria, 2.16%)。经过 Mann-Whitney 检验发现，黄色高温大曲中 Proteobacteria 的相对含量显著偏高 ($P < 0.05$)，平均相对含量为 5.29%，而在黑色高温大曲中仅为 0.07%。据报道，Proteobacteria 不仅是高温大曲的优势细菌门^[18]，同样也是清香型白酒中温大曲^[19]和芝麻香型白酒高温大曲^[20]等白酒

糖化发酵剂中的优势细菌门。

由图 1b 可知, 从 10 份高温大曲样本中共检测到 10 个优势细菌属, 其中黄色高温大曲样品以 *Bacillus*、高温放线菌属 (*Thermoactinomyces*) 和粘液乳杆菌属 (*Limosilactobacillus*) 为主, 平均相对含量分别为 26.64%、21.04% 和 14.30%, 丁芳^[21]和何猛超等^[22]分别对四川省某酒厂制曲车间和贵州无忧酒业的不同颜色高温大曲研究均发现 *Bacillus* 为黄曲的优势细菌属, 在 2 个地区酒厂的黄曲中平均相对含量分别为 44.89% 和 30.49%, 但 *Thermoactinomyces* 和 *Limosilactobacillus* 并不是 2 个地区酒厂黄曲的优势细菌属, 与本研究结果存在差异。 *Bacillus* 被认定为浓香型中温大曲和酱香型高温大曲的第一优势细菌属^[23]。其种类和含量对大曲和酒醅的质量产生直接影响, 进而影响白酒风味的形成^[24], 如地衣芽孢杆菌 (*B. licheniformis*) 可以产生脂肽类和肽类等抗生素, 对巴氏杆菌和大肠杆菌等产生明显的拮抗作用^[25], 枯草芽孢杆菌 (*B. subtilis*) 与酱香型白酒的主要风味物质的形成具有强相关性^[26]。 *Thermoactinomyces* 能够耐受高温, 产生高温淀粉酶和脱氢酶, 是大曲的核心功能性菌属。 *Limosilactobacillus* 可代谢葡萄糖或淀粉产生乳酸抑制腐败菌的繁殖, 维护酿酒环境, 同时乳酸与酯类结合能够形成乳酸乙酯^[20], 促进风味的形成。黑色高温大曲则以慢生芽孢杆菌属 (*Lentibacillus*) 和 *Kroppenstedtia* 为主, 平均相对含量分别为 34.46% 和 20.75%, 丁芳等^[21]对黑曲的优势细菌属的研究与本研究结果相似。 *Lentibacillus* 隶属于 Bacillaceae, 能分泌多种蛋白酶, 是具有强氨基酸代谢功能的优势降解菌属^[27]。 *Kroppenstedtia* 具有在高温高湿的环境下生长的能力, 是酱香型白酒高温大曲^[28]和酒醅^[29]中的主要菌属, 孟镇等^[30]对湖南地区酱香型白酒酒醅细菌群落与基酒的风味物质关系研究发现 *Kroppenstedtia* 是连接数最大的一个属, 与 23 个风味化合物之间存在显著的相关性, 其中包括大部分的酯类、醇类、醛类等。此外由图 1c 可知, 经 Mann-Whitney 检验发现, 黄色高温大曲中 *Thermoactinomyces*、*Limosilactobacillus* 和 *Weissella* 的平均相对含量均显著偏高 ($P < 0.05$), 而 *Lentibacillus* 和 *Kroppenstedtia* 的平均相对含量均显著偏低 ($P < 0.05$), 平均相对含量分别为 21.04%、14.30%、3.15%、34.45% 和 20.75%, 其在黑色高温大曲中平均相对含量分别为 1.93%、1.93%、0.036%、0.027%、34.45% 和 20.75%, 究其原因可

能与导致高温大曲形成不同颜色的机制有关。

2.2 两种类型高温大曲细菌菌群结构差异分析

本研究进一步采用统计学分析方法对黄色和黑色高温大曲细菌菌群结构进行解析, 结果如图 2 所示。

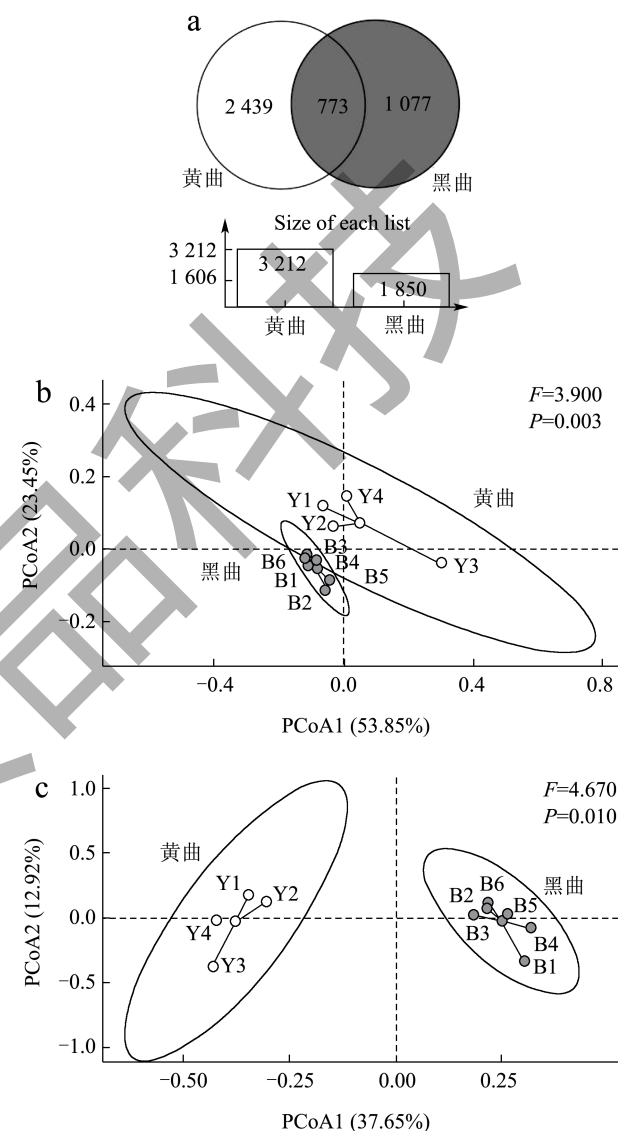


图 2 黄色和黑色高温大曲菌群结构分析

Fig.2 Analysis of the community structure of yellow and black high-temperature Daqu

注: (a) 细菌群落的 OTU 韦恩图; (b) 基于加权 UniFrac 距离的 PCoA 分析; (c) 基于非加权 UniFrac 距离的 PCoA 分析。

由图 2a 可知, 10 份高温大曲样品共划分了 4 289 个细菌 OTU, 其中 2 439 个 OTU 为黄色高温大曲特有, 1 077 个 OTU 为和黑色高温大曲特有, 773 个 OTU 为 2 种类型高温大曲共有。由此可见, 2 种类型高温大曲的细菌群落存在差异。由图 2b 可

知, 在考虑物种丰度的情况下, 黄色高温大曲样品分布较为分散, 黑色高温大曲样品分布较为集中。由图 2c 可知, 在仅考虑细菌种类而不考虑其丰度的情况下, 黄色和黑色高温大曲样品沿着第一主成分方向具有完全分离的趋势, 其中黄色高温大曲主要位于 X 轴负方向, 而黑色高温大曲主要位于 X 轴正方向。此外经 PERMANOVA 检验发现, 2 种类型高温大曲样品基于加权和非加权 UniFrac 的细菌菌群在整体上均存在非常显著差异 ($P < 0.01$), 表明无论是低丰度菌群还是高丰度菌群在这 2 个类型高温大曲样品间差异均显著。综上可知, 2 种类型高温大曲样品的细菌菌群结构间存在较大差异。

本研究进一步基于线性判别分析效应量 (Linear Discriminant Analysis Effect Size, LEfSe) 分析方法对 2 种不同类型高温大曲样品间细菌菌群显著性差异及标记物进行了分析, 结果如图 3 所示。

由图 3 可知, 当 LDA 评分在 3.5 分以上时黄色和黑色高温大曲样品的共存存在 6 个差异细菌属, 其中 *Thermoactinomyces*、*Limosilactobacillus*、*Weissella* 和 *Lactobacillus* 在黄色高温大曲中显著富集 ($P < 0.05$), *Kroppenstedtia* 和 *Lentibacillus* 在黑色高温大曲中显著富集 ($P < 0.05$)。由于 *Thermoactinomyces* 和 *Lentibacillus* 的 LDA 值最高, 因此可以分别作为黄色和黑色高温大曲的生物标志属, *Thermoactinomyces* 在黄色和黑色高温大曲中平均相对含量分别为 21.04% 和 1.93%, *Lentibacillus* 为 3.30% 和 34.45%。两种类型高温大曲间的差异微生物分析亦发现, 隶属于乳酸菌属的

Limosilactobacillus、*Weissella* 和 *Lactobacillus* 在黄色高温大曲中显著富集 ($P < 0.05$), 究其原因可能是乳酸菌较喜低温^[31], 而黄色高温大曲前期升温适中, 且较黑色高温大曲低, 因此其条件更适合乳酸菌生长。

2.3 两种类型高温大曲理化指标分析

本研究进一步对黄色和黑色高温大曲的理化指标进行了测定, 结果如表 1 所示。

表 1 黄色和黑色高温大曲理化指标分析结果
Table 1 Results of physicochemical indexes in yellow and black high-temperature Daqu

| 指标 | 黄曲 | 黑曲 | P 值 |
|----------------------------|--------------|--------------|-------|
| 水分含量/(g/100 g) | 9.75 ± 0.27 | 9.17 ± 0.21 | 0.033 |
| 水分活度/ <i>A_w</i> | 0.62 ± 0.01 | 0.60 ± 0.02 | 0.108 |
| 酸度/(mmol/10 g) | 0.5 ± 0.11 | 1.22 ± 0.37 | 0.010 |
| 淀粉含量/(g/100 g) | 61.25 ± 0.38 | 61.12 ± 1.17 | 0.821 |
| 发酵力/U | 0.53 ± 0.39 | 0.17 ± 0.11 | 0.208 |
| 液化力/U | 1.01 ± 0.33 | 0.03 ± 0.06 | 0.005 |
| 糖化力/U | 544 ± 61.81 | 32 ± 18.99 | 0.008 |
| 酯化力/U | 603 ± 107.62 | 198 ± 67.54 | 0.010 |
| 酒化力/U | 4.90 ± 0.48 | 1.48 ± 1.73 | 0.009 |
| 灰分/(g/100 g) | 1.91 ± 0.05 | 1.85 ± 0.12 | 0.319 |
| 氨基酸态氮/(g/kg) | 4.02 ± 0.61 | 6.96 ± 1.45 | 0.012 |
| 蛋白质含量/% | 13.40 ± 0.31 | 13.82 ± 1.02 | 0.479 |

注: 9.75 ± 0.27 为平均值 ± 标准差; P 值为黄色和黑色高温大曲理化指标的差异性分析参数。

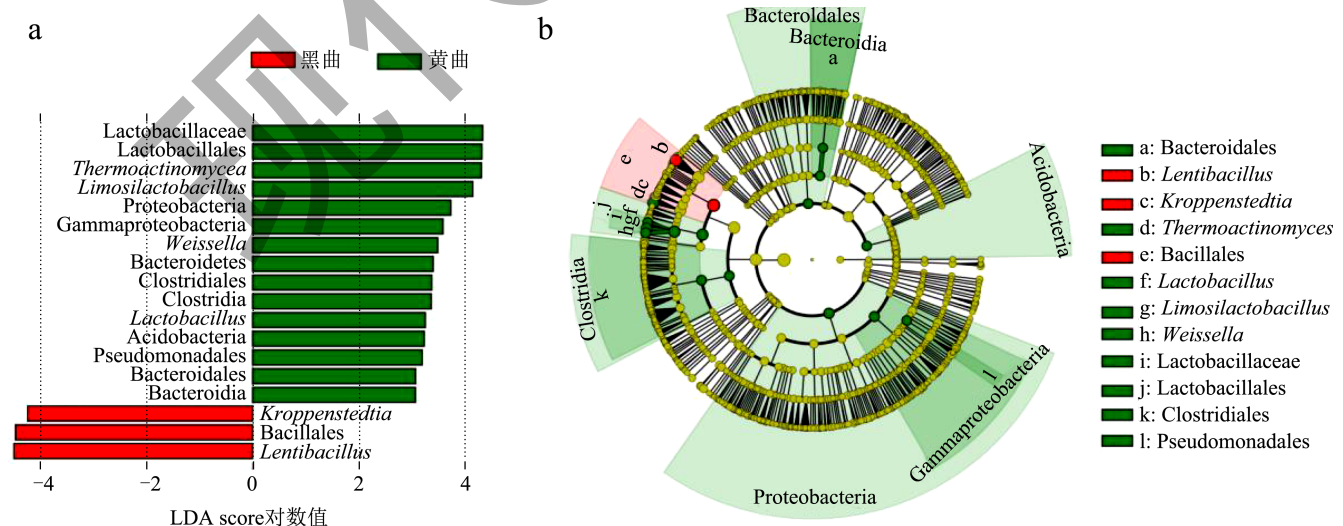


图 3 黄色和黑色高温大曲微生物 LDA 分析

Fig.3 LDA analysis of microorganisms in yellow and black high-temperature Daqu

注: (a) 细菌 LDA score; (b) 细菌分类等级树。

由表 1 可知, 黄色高温大曲样品的平均水分含量为 9.75 g/100 g, 显著高于黑色高温大曲的 9.17% ($P<0.05$), 平均酸度为 0.55 mmol/10 g, 显著低于黑色大曲的 1.22 mmol/10 g ($P<0.05$)。王颖等^[5]对赤水河 2 个产区的高温大曲研究亦发现, 在水分含量上黄曲大于黑曲, 在酸度上黄曲小于黑曲, 与本研究结果一致。水分含量过高会影响大曲的贮藏性能, 而过低则会影响微生物的生长代谢^[21], 通过对 2 种类型高温大曲微生物群落结构分析可知 *Limosilactobacillus*、*Weissella* 和 *Lactobacillus* 等乳酸菌在黄曲高温大曲中显著富集 ($P<0.05$), 因此黄曲高温大曲产酸代谢更加旺盛, 从而使其酸度更低^[32]。由表 2 亦可知黄曲高温大曲的平均液化力、糖化力、酯化力和酒化力分别为 1.01、544、603 和 490 U, 显著于黑色高温大曲的 0.028、32、198 和 1.48 U ($P<0.01$), 液化力、糖化力和酯化力的大小可以反映样品中淀粉酶、蛋白酶、脂肪酶等酶系的活力大小^[33]。有研究表明, 芽孢杆菌的微生物代谢活动是影响大曲酶活的重要因素^[34], 酒化力是指大曲中某些微生物将淀粉分解转化为酒精的能力^[35], 说明黄曲高温大曲的出酒率相较于黑色高温大曲可能更高。综上可知, 黄色和黑色高温大曲之间的理化性质存在较大差异, 这些指标的差异可能与 2 种类型大曲中不同的微生物群落组成有着直接的关联性。

2.4 高温大曲优势细菌属与理化指标的关联性分析

据报道, 微生物的代谢活动会影响大曲的理化性质, 从而影响大曲的功能表现和白酒香气形成, 因此本研究进一步对优势细菌属与理化指标间的关联性进行了探讨, 结果如图 4 所示。

由图 4a 可知, 2 种类型高温大曲的优势细菌属与理化指标之间具有显著的关联性 ($P<0.05$), 因此, 本研究进一步对 2 种类型高温大曲样品中优势细菌属与理化指标之间的关联性进行了研究。由图 4b 可知, *Lentibacillus* 与酒化力显著负相关 ($P<0.05$), *Kroppenstedtia* 与糖化力和酯化力显著负相关 ($P<0.05$), 其在黑色高温大曲中显著富集, 因此推测黑曲样品酒化力、糖化力和酯化力较低可能与之相关。*Bacillus* 与发酵力、液化力和酒化力显著正相关 ($P<0.05$), 王清龙等^[36]对大曲、小曲、陶融型混合曲的微生物与理化指标关联性分析结果与本研究一致。*Thermoactinomyces* 与酸度和氨基酸态氮显著负相关 ($P<0.05$), 与水分含

量、发酵力、液化力和糖化力显著正相关 ($P<0.05$), *Limosilactobacillus* 与水分含量、发酵力、液化力、糖化力、酯化力和酒化力显著正相关 ($P<0.05$), 而 *Bacillus*、*Thermoactinomyces* 和 *Limosilactobacillus* 在黄曲中显著富集, 说明黄曲的品质更佳, 因此在实际生产中应该加大黄曲的应用比例, 更有利于白酒品质的提升。综上所述, 微生物与大曲的品质指标之间存在着复杂的关系, 因此在后续研究中应该对高温大曲样品采集的种类、数量和范围进行扩大, 并且结合更先进、更准确的超高深宏基因组测序对其中的微生物信息进行挖掘, 对更多的低丰度物种进行捕获, 为提升高温大曲的品质提供数据支持。

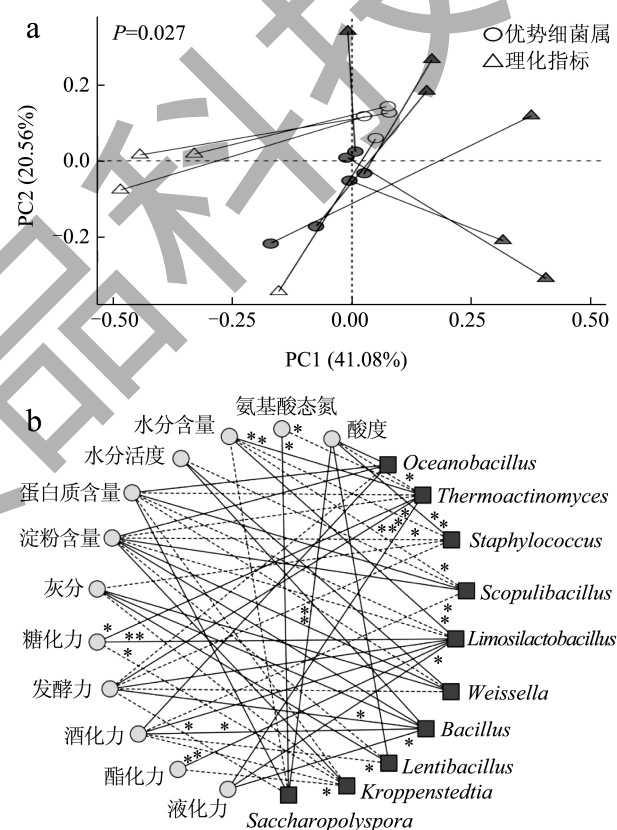


图 4 优势细菌属与理化指标间的相关性分析。

Fig. 4 Correlation analysis between dominant bacterial genera and physicochemical indicators

注: (a) 理化指标与优势细菌属的普氏分析; (b) 相关性网络图。图中实线表示正相关, 虚线表示负相关, “*”表示 $P<0.05$, 相关性显著; “**”表示 $P<0.01$, 相关性非常显著, “***”表示 $P<0.001$, 相关性极显著。

2.5 高温大曲细菌菌株的分离鉴定

通过纯培养技术, 本研究进一步从 10 份高温大曲样品中分离纯化得到 33 株细菌菌株, 其与模式菌株的系统发育树结果如图 5 所示。

品质亦会产生影响, 所以应该积极开展对大曲样品中不同芽孢杆菌分离株生长特性的研究, 以期为大曲的强化提供数据支撑。

3 结论

本研究中的黄色和黑色高温大曲细菌菌群和理化指标间存在明显差异, 其中黄曲高温大曲的生物标志物是 *Thermoactinomyces*, 其水分含量、液化力、糖化力、酯化力和酒化力显著偏高, 黑色高温大曲的生物标志物是 *Lentibacillus*, 其酸度和氨基酸态氮显著偏高。研究证明优势细菌属与理化指标之间的相关性显著, 其中 *Thermoactinomyces* 与酸度和氨基酸态氮的形成相关, *Lentibacillus* 与酒化力的形成相关, *Bacillus* 与发酵力、液化力和酒化力的形成相关。纳入研究中的高温大曲中可培养细菌类群主要以 *Bacillus* 为主, 且 *B. licheniformis* 为优势分离株。本研究为进一步了解不同类型高温大曲微生物和理化特性的差异提供了数据支撑。

参考文献

- [1] ZUO Q C, HUANG Y G. Evaluation of bacterial diversity during fermentation process: a comparison between handmade and machine-made high-temperature Daqu of Maotai-flavor liquor [J]. *Annals of Microbiology*, 2020, 70(1): 1-10.
- [2] ZHANG Y D, SHEN Y, CHENG W, et al. Understanding the shifts of microbial community and metabolite profile from wheat to mature Daqu [J]. *Frontiers in Microbiology*, 2021, 12(7): 714726.
- [3] 张芮, 刘文虎, 张立强, 等. 基于宏基因组学解析高温大曲微生物群落与功能的异质性[J]. *酿酒科技*, 2023, 5: 70-77.
- [4] DENG L, MAO X, LIU D, et al. Comparative analysis of physicochemical properties and microbial composition in high-temperature Daqu with different colors [J]. *Frontiers in Microbiology*, 2020, 27(11): 588117.
- [5] 王颖, 邱勇, 王隆, 等. 不同产区酱香型高温大曲黑、白、黄曲的理化、挥发性成分差异性分析[J]. *中国调味品*, 2022, 47(6): 155-159.
- [6] MA W R, GENG X J, JIA F C, et al. Investigation of microbial composition and functional characterization of Zangqu using high throughput sequencing [J]. *LWT-Food Science and Technology*, 2021, 136(8): 110342.
- [7] TIAN N, GUO X, WANG M Z, et al. Bacterial community diversity of shilixiang baijiu Daqu based on metagenomics [J]. *Journal of Food Biochemistry*, 2020, 44(10): e13410.
- [8] 杜艳红, 谭昊, 聂建光, 等. 基于高通量测序技术对红星大曲中微生物多样性的相关研究[J]. *酿酒科技*, 2022, 9: 33-40.
- [9] QB/T 4257-2011, 酿酒大曲通用分析方法[S].
- [10] GB 5009.5-2016, 食品中蛋白质的测定[S].
- [11] CHEN L, LI Y Z, JIN L, et al. Analyzing bacterial community in pit mud of Yibin Baijiu in China using high throughput sequencing [J]. *PeerJ*, 2020, 8(5): e9122.
- [12] HU X L, WANG K L, CHEN M E, et al. Profiling the composition and metabolic activities of microbial community in fermented grain for the Chinese strong-flavor Baijiu production by using the metatranscriptome, high-throughput 16S rRNA and ITS gene sequencings [J]. *Food Research International*, 2020, 138(12): 109765.
- [13] MAGOC T, STEVEN L. FLASH: fast length adjustment of short reads to improve genome assemblies [J]. *Bioinformatics*, 2011, 27(21): 2957-2963.
- [14] EDGAR R C. Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST [J]. *Bioinformatics*, 2010, 26(19): 2460-2461.
- [15] SANTOS M F, SOUZA I G B, GOMES S O, et al. Isolation and characterization of microsatellite markers in the spiny lobster, *Panulirus echinatus* Smith, 1869 (Decapoda: Palinuridae) by Illumina MiSeq sequencing [J]. *Journal of Genetics*, 2018, 97(1): 25-30.
- [16] XIONG X, HU Y, YAN N, et al. PCR-DGGE analysis of the microbial communities in three different Chinese "Baiyunbian" liquor fermentation starters [J]. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2014, 24(8): 1088-1095.
- [17] 葛东颖, 王玉荣, 向凡舒, 等. 荆州地区鲜广椒乳酸菌多样性解析及其分离株发酵特性的评价[J]. *中国食品添加剂*, 2019, 30(4): 72-79.
- [18] ZHU M, ZHENG J, XIE J, et al. Effects of environmental factors on the microbial community changes during medium-high temperature Daqu manufacturing [J]. *Food Research International*, 2022, 153(1): 110955.
- [19] 冯佳婷, 陆震鸣, 时伟, 等. 不同培养温度对大曲微生物群落结构、酶活及挥发性化合物的影响[J]. *应用与环境微生物学报*, 2021, 27(3): 760-767.
- [20] 李仍树, 赵德义, 王梦立, 等. 四种芝麻香型白酒酿造用曲理化性质和微生物群落的比较研究[J]. *中国酿造*, 2023, 42(7): 30-35.
- [21] 丁芳, 张原岷, 蒋英丽, 等. 不同等级高温大曲微生物群落和代谢物的特征分析[J]. *中国酿造*, 2022, 41(11): 24-30.
- [22] 何猛超, 任义平, 熊林, 等. 茅台地区不同高温大曲微生物群落结构解析[J]. *中国酿造*, 2022, 41(6): 51-57.
- [23] SUN W, XIAO H, PENG Q, et al. Analysis of bacterial diversity of Chinese Luzhou-flavor liquor brewed in different seasons by Illumina Miseq sequencing [J]. *Annals of Microbiology*, 2016, 66(6): 1293-1301.

- [24] WEI Y, ZOU W, SHEN C H, et al. Basic flavor types and component characteristics of Chinese traditional liquors [J]. *Journal of Food Science*, 2020, 85(12): 4096-4107.
- [25] 黄永光,杨国华,张肖克,等.产酱香风味芽孢杆菌类菌株发酵代谢产物及其酶分析研究[J].*酿酒科技*,2013,1:41-45.
- [26] 张春林,蒲春,白从广,等.高温大曲中产酱香风味细菌的筛选及其产香特性研究[J].*食品科技*,2022,47(5):1-6.
- [27] ZHANG L L, LI L J, PAN X G, et al. Enhanced growth and activities of the dominant functional microbiota of chicken manure composts in the presence of maize straw [J]. *Frontiers in Microbiology*, 2018, 9(5): 1131.
- [28] 吴正坤,刘蒲临,杨团元,等.不同贮存期高温大曲微生物群落演替与理化指标相关性分析[J].*中国酿造*,2023, 42(7):160-166.
- [29] 王欢,席德州,黄永光,等.酱香型白酒机械化酿造不同轮次堆积发酵细菌菌群结构多样性分析[J].*食品科学*, 2020,41(2):188-195.
- [30] 孟镇,张媛媛,胡雯钦,等.湖南地区酱香型白酒酒醅细菌多样性及其与基酒风味物质相关性分析[J].*中国酿造*, 2023,42(6):28-36.
- [31] SHI C, MAKTABDAR M. Lactic acid bacteria as biopreservation against spoilage molds in dairy products-A review [J]. *Frontiers in Microbiology*, 2022, 12(1): 819684.
- [32] TAO Y, LI J B, RUI J P, et al. Prokaryotic communities in pit mud from different-aged cellars used for the production of Chinese strong-flavored liquor [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2014, 80(7): 2254-2260.
- [33] 施思,彭智辅,乔宗伟,等.浓香型大曲贮藏过程中糖化力发酵力变化及真菌多样性分析[J].*食品与发酵工业*, 2017,43(5):76-79.
- [34] WANG P, WU Q, JIANG X J, et al. *Bacillus licheniformis* affects the microbial community and metabolic profile in the spontaneous fermentation of Daqu starter for Chinese liquor making [J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2017, 250(6): 59-67.
- [35] LIU J J, CHEN J Y, FAN Y, et al. Biochemical characterisation and dominance of different hydrolases in different types of Daqu-a Chinese industrial fermentation starter [J]. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2018, 98(1): 113-121.
- [36] 王清龙,朱甜甜,刘延波,等.白酒生产不同酒曲微生物群落结构、理化指标及挥发性风味物质研究[J].*中国酿造*,2023,42(7):93-102.
- [37] 张立强,冉茂芳,王松涛,等.泸州老窖大曲中高产纤溶酶菌株的分离及鉴定[J].*酿酒科技*,2021,3:17-24.