

四川省内不同中高温大曲己酸菌群组成差异分析

王永军¹, 卫春会^{1,2}, 李彦中³, 曾波¹, 黄治国^{1,2}, 黄书琴¹, 任志强^{1,2*}

(1. 四川轻化工大学酿酒生物技术及应用四川省重点实验室, 四川宜宾 644000)

(2. 中国轻工业酿酒生物技术及智能制造重点实验室, 四川宜宾 644000)

(3. 四川江口醇隆鼎酒业有限公司, 四川巴中 636400)

摘要: 为研究中高温大曲己酸菌群组成, 以4种四川省内不同中高温大曲为研究对象, 用富集培养基进行富集后对大曲和大曲富集液样本宏基因组 DNA 进行 16S rRNA 基因扩增子高通量测序, 分析大曲中的己酸菌群组成。结果表明, 经富集后, 大曲潜在己酸菌群多样性和丰度增加, 在大曲中潜在的优势己酸菌(相对丰度大于1%)包括 *Clostridium_sensu_stricto_18* 占 2.19%~69.00%、*Clostridium_sensu_stricto_15* 占 1.76%~7.65% 以及少量的 *Clostridium_sensu_stricto_12*、*Clostridium_sensu_stricto_1*、*Clostridium_sensu_stricto_10*、*Clostridium_sensu_stricto_7* 和 *Caproiciproducens*。其中, Q1 大曲以 *Clostridium_sensu_stricto_18*、*Clostridium_sensu_stricto_15*; Q2 大曲以 *Clostridium_sensu_stricto_1*、*Caproiciproducens*、*Clostridium_sensu_stricto_18*; Q3 大曲以 *Clostridium_sensu_stricto_18*、*Caproiciproducens*; Q4 大曲以 *Clostridium_sensu_stricto_18*、*Clostridium_sensu_stricto_1* 为主要的潜在己酸菌群组成。研究表明四川省内不同中高温大曲的己酸菌群组成存在差异, 对其进行了初步分析, 为大曲中己酸菌的定向研究提供理论依据, 也为制备优质大曲促进浓香型白酒酒质的提升提供方向。

关键词: 己酸菌; 中高温大曲; 厌氧富集; 高通量测序

文章编号: 1673-9078(2025)01-89-96

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2025.1.1386

Differential Analysis of Microbial Composition of Different Medium/high-Temperature Daqu in Sichuan

WANG Yongjun¹, WEI Chunhui^{1,2}, LI Yanzhong³, ZENG Bo¹, HUANG Zhiguo^{1,2}, HUANG Shuqin¹,
REN Zhiqiang^{1,2*}

(1.Sichuan University of Science & Engineering, Liquor Making Biotechnology and Application of Key Laboratory of Sichuan Province, Yibin 644000, China)(2.Liquor Brewing Biotechnology and Intelligent Manufacturing Key Laboratory of China Light Industry, Yibin 644000, China)

(3.Sichuan Jiangkou Alcohol Longding Wine Industry Co. Ltd., Bazhong 636400, China)

Abstract: In order to study the composition of caproic acid-producing bacterial community in Medium/high-temperature Daqu, four different medium/high-temperature Daqu in Sichuan were used as the research objects. After

引文格式:

王永军,卫春会,李彦中,等.四川省内不同中高温大曲己酸菌群组成差异分析[J].现代食品科技,2025,41(1):89-96.

WANG Yongjun, WEI Chunhui, LI Yanzhong, et al. Differential analysis of microbial composition of different medium/high-temperature Daqu in sichuan [J]. Modern Food Science and Technology, 2025, 41(1): 89-96.

收稿日期: 2023-11-21

基金项目: 四川省科技创新创业苗子工程项目(23MZGC0042); 酿酒生物技术及应用四川省重点实验室开放基金项目(NJ2022-07); 四川江口醇隆鼎酒业有限公司院士(专家)工作站项目(HX2022065)

作者简介: 王永军(1997-), 男, 在读硕士, 研究方向: 酿酒生物技术及应用, E-mail: 1600436816@qq.com

通讯作者: 任志强(1985-), 男, 博士, 讲师, 研究方向: 酿酒微生物与分子生物学, E-mail: zhiqren@foxmail.com

the enrichment with the enrichment medium, the metagenomic DNA of Daqu and Daqu enrichment liquid samples were subjected to high-throughput sequencing with 16S rRNA gene amplicons, and the composition of caproic acid-producing bacterial community in Daqu was analyzed. The results showed that the diversity and abundance of the potential caproic acid-producing bacterial community in Daqu increased after the enrichment. The potential dominant caproic acid-producing bacteria (relative abundance >1%) in Daqu included *Clostridium_sensu_stricto_18* (2.19%~69.00%), *Clostridium_sensu_stricto_15* (1.76%~7.65%) and a small amount of *Clostridium_sensu_stricto_12*, *Clostridium_sensu_stricto_1*, *Clostridium_sensu_stricto_10*, *Clostridium_sensu_stricto_7* and Caproiciproducens. Among them, in terms of the main potential caproic acid-producing bacterial community, Q1 Daqu was dominant with *Clostridium_sensu_stricto_18*, and *Clostridium_sensu_stricto_15*; Q2 Daqu was dominant with *Clostridium_sensu_stricto_1*, Caproiciproducens, and *Clostridium_sensu_stricto_18*; Q3 Daqu was dominant with *Clostridium_sensu_stricto_18*, and Caproiciproducens; Q4 Daqu was dominant with *Clostridium_sensu_stricto_18*, and *Clostridium_sensu_stricto_1*. The results showed that there were differences in the composition of caproic acid-producing bacterial communities in different medium/high-temperature Daqu in Sichuan. The preliminary analysis was carried out to provide a theoretical basis for the directional study of caproic acid-producing bacteria in Daqu, and also provide a direction for the preparation of high-quality Daqu to promote the quality improvement of Nongxiangxing liquor.

Key words: caproic acid-producing bacteria; medium-high-temperature daqu; anaerobic enrichment; high-throughput sequencing

己酸是浓香型白酒主体风味物质己酸乙酯的前体物质^[1,2]。因此,己酸菌普遍被认为是浓香型白酒酿造过程中最重要的一类功能微生物之一^[3]。己酸菌是从乳酸、D-葡萄糖、乙醇、D-半乳糖和醇类化合物中提取营养成分并经过代谢生成己酸的一类微生物的总称,其可以将乙醇、乳酸等代谢物氧化生成乙酰辅酶A和部分乙酸,产生的乙酰辅酶A会进入循环的逆 β 氧化途径。在每个逆 β 氧化周期,首先乙酰辅酶A会偶联其他辅酶A衍生物以形成增加两个碳的新的辅酶A衍生物,乙酸的碳链被乙酰辅酶A延长两个碳生成丁酸,丁酸的碳链再被丁酰辅酶A与乙酰辅酶A延长两个碳生成己酸^[4-7]。随着研究的深入,越来越多的己酸菌被发现^[8,9],能产己酸的微生物主要来自于梭菌纲梭菌属(*Clostridium*)^[10,11]、梭菌纲瘤胃菌科(Ruminococcaceae)^[1,4]、芽孢杆菌属(*Bacillus*)^[12,13]和巨球型菌属(*Megasphaera rogosa*)^[14]等。其中梭菌属是梭菌纲中一个重要的属,严格厌氧,能够和芽孢杆菌属、热厌氧杆菌属(*Thermoanaerobacterium*)及甲烷菌属(*Methanogen*)等在共培养发酵体系中生成丁醇、丁酸、己酸、辛酸等高价化合物^[15,16]。

中高温大曲是浓香型白酒专用的糖化发酵剂,传统工艺将大曲长期存放于开放性的操作环境中自然接种,定向富集了制曲环境中的大量微生物^[17]。在制曲过程中会产生多种酶系,并形成有利于浓香型白酒酒质的自然复合体,因此自古以来就有“曲

为酒之骨”之称^[18,19]。目前,关于己酸菌的研究主要集中在窖泥和酒醅中,针对大曲中己酸菌群组成的研究甚少。由于己酸菌在大曲中的含量低、菌体处于封闭状态未能激发其产己酸或者序列信息不足等原因,直接研究大曲中的己酸菌群组成较为困难。本文选用4种四川不同地区的中高温大曲,以己酸含量为指标,对大曲中的己酸菌进行富集培养,提取大曲和大曲富集液样本宏基因组DNA进行16S rRNA基因扩增子高通量测序以分析大曲中的己酸菌群组成,研究四川省内不同中高温大曲己酸菌群组成的差异性。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

大曲:从四川不同地区的4个优质酒厂取得,1号大曲取自川东编号为Q1;2号大曲取自川南编号为Q2;3号大曲取自川西编号为Q3;4号大曲取自川北编号为Q4。曲块粉碎后四分法缩分成1000g为所取试样,每种大曲样品各取3个重复,分别装入无菌袋运回实验室置于4℃冰箱保存备用。

主要试验试剂:正己酸,色谱纯,上海安谱实验科技股份有限公司;2-乙基丁酸,色谱纯,成都市科隆化学品有限公司;生物素,分析纯,成都市科隆化学品有限公司;对氨基苯甲酸,分析纯,成都市科隆化学品有限公司;DNA提取试剂盒,美国Thermo公司。

1.2 主要仪器与设备

Micro 21R 高速冷冻离心机, 美国 Thermo 公司; ChemiDoc XRS+ 凝胶成像系统, 美国 Bio-rad 公司; 7890B-7000D 气相色谱-质谱仪, 美国安捷伦公司; DHD 电热恒温鼓风干燥箱, 成都晟杰科技有限公司; MYP11-2A 恒温磁力搅拌器, 上海梅颖浦仪器仪表制造有限公司; LRH-250 生化培养箱, 上海齐欣科学仪器有限公司; CI54DS 立式压力蒸汽灭菌锅, 厦门仪器有限公司; SHZ-D (III) 循环水式多用真空泵, 上海力辰邦西仪器科技有限公司。

1.3 富集培养基

根据己酸菌对碳源的利用特性, 分别使用 mCGM-乳酸培养基^[20,21](以乳酸为碳源)、乙醇酵母粉培养基(以乙醇为碳源)、己酸菌分离培养基^[22,23](主要含乙酸钠, 微量离子等)、强化梭菌培养基^[21](以葡萄糖为碳源)对大曲进行厌氧培养。培养基灭菌条件均为 121 °C 灭菌 20 min。

(1) mCGM-乳酸培养基 (mCGM, g/L): 蛋白胨 10, 酵母浸粉 10, 硫酸铵 2, 磷酸二氢钠 1, 磷酸氢二钾 0.5, 硫酸镁 0.1, 七水合硫酸亚铁 0.015, 硫酸锰 0.01, 氯化钴 0.01, 硫酸锌 0.002, 乳酸 18, 乙酸钠 2.5, 碳酸钙 10, 对氨基苯甲酸 0.01, 生物素 0.000 5, pH 值调为 5.5。

(2) 乙醇酵母粉培养基 (YJ, g/L): 酵母粉 6; 碳酸钙 30 (灭菌后加入), 40 mL 无水乙醇 (灭菌后加入), 对氨基苯甲酸 0.01, 生物素 0.000 5, 自然 pH 值。

(3) 己酸菌分离培养基 (JF, g/L): 乙酸钠 8; 氯化镁 0.002 5; 氯化铵 0.000 5; 硫酸镁 0.002 5; 硫酸钙 0.01; 硫酸亚铁 0.005; 钼酸钠 0.002 5, 对氨基苯甲酸 0.01, 生物素 0.000 5, 自然 pH 值。

(4) 强化梭菌培养基 (RCM, g/L): 蛋白胨 10, 牛肉膏 10, 酵母膏 3, 葡萄糖 5, 可溶性淀粉 1, 氯化钠 5, 无水乙酸钠 3, L-半胱氨酸盐酸盐 0.5, 对氨基苯甲酸 0.01, 生物素 0.000 5, pH 值调为 5.5。

1.4 己酸检测方法

发酵液预处理: 取 1 mL 发酵液, 加入 100 μ L 甲酸酸化处理和 1 mL 2-乙基丁酸 (5 g/L) 作为内标校正, 用无水乙醇定容至 5 mL。充分混匀后, 以 12 000 r/min 离心 5 min, 上清液用 0.22 μ m 滤膜过滤以去除活菌, 取滤液 1 mL 用于上机检测。

气相色谱条件: 毛细管色谱柱为 LZP-930

(30 m \times 0.32 mm \times 1.0 μ m); 不分流; 进样量 1 μ L; 进样口温度为 230 °C; 程序升温: 50 °C 保持 6 min, 5 °C/min 升温至 170 °C, 保持 5 min; 载气: 高纯度氮气; 载气压力: 0.05 MPa。使用外标法定量, 将样品的峰面积通过己酸标准曲线回归方程进行计算, 可得到所测样品的己酸含量。

1.5 大曲中己酸菌的富集

厌氧发酵装置使用 100 mL 带有橡胶内塞和孔洞外盖的蓝盖瓶, 便于抽真空和密封。将装有 50 mL 培养基的蓝盖瓶进行灭菌, 培养基冷却后, 接种 1% (m/V) 的大曲粉, 真空泵抽尽空气以保证瓶内处于厌氧环境, 置于生化培养箱中恒温富集培养。

1.6 大曲及其富集液样品基因组 DNA 的提取、PCR 扩增和测序

按照操作指南使用 Dnasy PowerSoil 土壤微生物 DNA 提取试剂盒提取大曲及其富集液基因组 DNA。利用引物 338F (5'-ACTCCTACGGGAGGCAGC-3') 和 806R 融合引物 (5'-7 bp barcode+GGACTACHVG GGTWTCTAAT-3') 对混合样本中的大曲基因组 16S rRNA 序列中的 V4 可变区进行扩增。经琼脂糖凝胶电泳对提取的 DNA 进行质量检测合格后由上海美吉生物技术有限公司进行建库和测序。

1.7 数据处理

试验结果用平均值 \pm 标准差表示, 每组试验均重复 3 次。采用 SPSS 19.0 软件进行单因素方差分析, 利用 Origin 2022 作图。原始测序数据利用 Fastp v0.19.6 对序列质量进行质控和过滤并用 Flash v1.2.7 合并序列, 获得质控拼接之后的优化数据, 然后用 DADA2 对数据进行降噪处理获得扩增子序列变体 (Amplicon Sequence Variant, ASV) 代表序列和丰度信息, 最后用 RDP 的 RNA 数据库 (Silva v138) 进行注释。基于上海美吉生物云平台的微生物多样性 QIIME2 流程和 ASV 代表序列及丰度信息进行 α 多样性分析、Venn 图绘制、丰度等级曲线图绘制、主坐标分析 (Principal Coordinate Analysis, PCoA)。

2 结果与分析

2.1 己酸菌富集方法的优化

2.1.1 不同培养基对大曲产己酸的影响

以 Q1 大曲为对象进行富集方法的优化, 将大曲接种到 4 种培养基中在 37 °C 条件下进行富

集。由于在微生物合成己酸过程中，丁酸作为中间产物会被首先合成，之后再行己酸的合成^[24]，故将培养时间设置在 20 d 后测定富集液中的己酸含量。如图 1 所示：4 种不同培养基大曲富集液的己酸含量差异显著 ($P < 0.05$)，从高到底排序依次为 RCM > mCGM > YJ > JF，己酸产量表现最好的培养基为 RCM 培养基和 mCGM-乳酸培养基，己酸含量分别达到了 2.72 g/L、1.91 g/L，其余两种培养基也能够产己酸，但效果欠佳。大曲在这 4 种培养基中均有己酸产生，足以说明大曲具有在厌氧条件下产己酸的能力，其可能存在产己酸功能微生物。发酵结束后 4 种富集液的己酸含量有较大差异，可能是 4 种培养基含有营养物质的不同，产己酸的过程受到影响，己酸代谢途径和酶活的不同所导致^[25]。因此选择 RCM 培养基和 mCGM-乳酸培养基作为最佳富集培养基富集 4 种中高温大曲中的己酸菌。

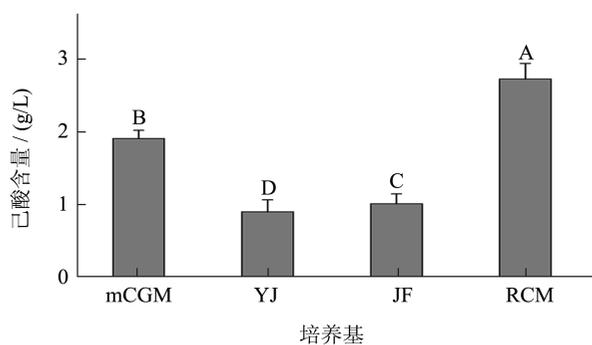


图 1 不同培养基对大曲产己酸的影响

Fig.1 Effects of different culture media on caproic acid production by Daqu

注：不同培养基富集液间的差异用大写字母表示，不具有相同字母的表示差异显著 ($P < 0.05$)。

2.1.2 发酵时间对大曲产己酸的影响

为探究中高温大曲己酸产量随时间的变化规律，在富集培养基中接种 Q1 大曲后于 37 °C 条件下进行富集培养，每隔 3 d 检测富集液己酸的含量。由图 2 所示：两种培养基发酵后己酸的含量随发酵时间的变化趋势均为先逐渐增加后趋于平衡。在发酵前 6 d，大曲中的微生物处于适应环境的过程，对培养基中营养物质的利用还不够充分，因此表现为不产己酸或者己酸含量增加较为缓慢；从发酵第 15 天开始，两种培养基下大曲发酵液中的己酸含量呈对数型趋势增加，直至第 24 天达到最高点，此时 RCM 培养基中富集液己酸含量达 3.03 g/L，在 mCGM-乳酸培养基富集液己酸含量达 2.52 g/L；随

着发酵的进行，24 d 后己酸含量逐渐趋于稳定。因此把 24 d 作为大曲富集己酸菌的最佳培养时间。

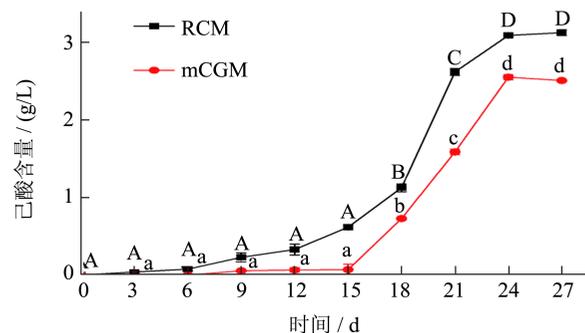


图 2 发酵时间对大曲产己酸的影响

Fig.2 Effect of fermentation time on caproic acid production of Daqu

注：RCM 培养基富集液间的差异用大写字母表示，mCGM-乳酸培养基富集液间的差异用小写字母表示，不具有相同字母的表示差异显著 ($P < 0.05$)，下同。

2.1.3 发酵温度对大曲产己酸的影响

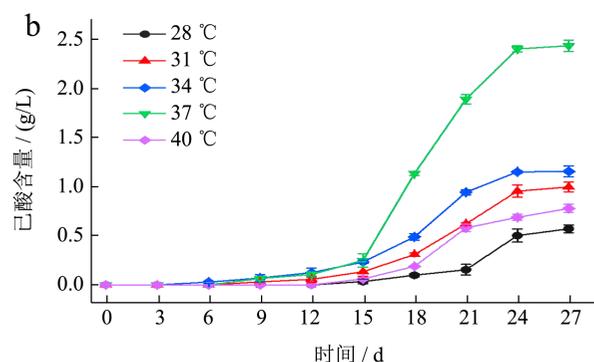
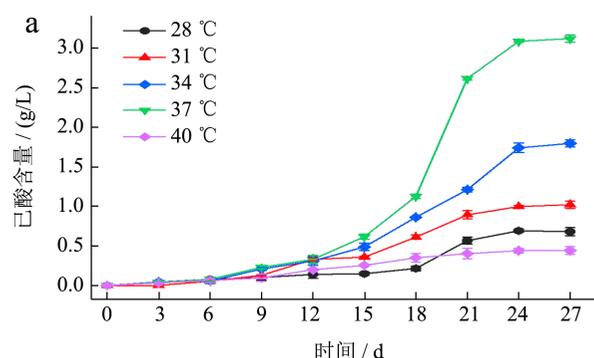


图 3 RCM 培养基 (a) 和 mCGM-乳酸培养基 (b) 发酵温度对大曲产己酸的影响

Fig.3 Effects of fermentation temperature on caproic acid production by Daqu in RCM medium (a) and mCGM-lactic acid medium (b)

为探究温度对中高温大曲发酵产己酸的影响，设置了 5 个温度梯度进行大曲己酸菌的富集，在富集培养基中接种 Q1 大曲后进行厌氧培养，每隔 3 d

检测富集液己酸的含量。如图3所示,在各个温度下,两种培养基在6~12 d开始生成少量己酸,并在15 d后开始,己酸含量大幅上升,在24 d己酸含量达到最大。两种培养基均在37 °C富集条件下富集液的己酸含量最高,其中,RCM培养基中富集液己酸含量达3.13 g/L,在mCGM-乳酸培养基富集液己酸含量达2.43 g/L。因此把37 °C作为大曲富集己酸菌的最佳培养温度。

2.2 大曲中己酸菌的富集

根据前面所确定的己酸菌最佳富集条件,将4种大曲进行富集培养后各富集液己酸含量情况如图4所示。利用RCM培养基的4种富集液当中,大曲富集液己酸含量从高到低依次为Q1 (2.97 g/L) > Q3 (2.04 g/L) > Q2 (2.03 g/L) > Q4 (1.28 g/L),其中Q3和Q2大曲富集液己酸含量差异不显著 ($P > 0.05$),与Q1、Q4大曲富集液差异达到显著 ($P < 0.05$);同样在利用mCGM-乳酸培养基富集的4种富集液当中,大曲富集液己酸含量从高到低依次为Q1 (2.53 g/L) > Q3 (1.67 g/L) > Q2 (1.66 g/L) > Q4 (0.57 g/L),Q3和Q2大曲富集液之间己酸含量差异不显著 ($P > 0.05$),与Q1、Q4大曲富集液之间差异达到显著 ($P < 0.05$)。4种中高温大曲在厌氧条件下产己酸的能力不一样,这可能与大曲的己酸菌群丰度和组成差异有关^[26]。可以看出在中高温大曲在不同培养基中己酸的产量存在差异,RCM培养基更有利于大曲己酸菌的富集和己酸合成。所有大曲富集液均产生了己酸,说明已经成功富集到大曲中的己酸菌,可用于后续己酸菌群组成分析。

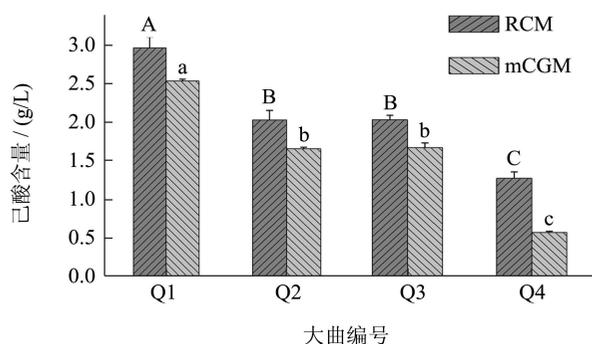


图4 4种大曲富集后的己酸产量

Fig.4 The caproic acid yield of four kinds of Daqu after enrichment

2.3 大曲及其富集液细菌群落结构分析

2.3.1 大曲及其富集液菌群多样性分析

多次重复试验的12个混合样本经测序后,共获

得254 812条序列,聚类分析共产生1 984个OTU分类。如表1所示,对比大曲富集前后的12个样品,微生物菌群的Ace指数和Chao指数均有所下降,说明经过富集之后大曲微生物群落的丰富度降低,这可能是培养基富集选择的结果;由Shannon指数和Simpson指数可以看到,大曲经mCGM-乳酸培养基富集后,其物种多样性变化不大,而大曲经RCM培养基富集后,其物种多样性降低。12个样品的Coverage指数都接近100%,说明测序结果能反映样本的真实情况。大曲经过富集后,菌群的丰富度和多样性都有一定的变化,表明起到了富集的效果。

2.3.2 大曲富集液中细菌微生物群落结构分析

在属水平上分析大曲样品的细菌微生物群落组成,将相对丰度大于1%的细菌属(相对丰度小于1%的细菌属归类为Others)绘制成群落堆积柱状图。如图5可知,Q2大曲细菌属中相对丰度最多的为魏斯氏菌属(*Weissella*, 38.97%),Q4大曲和Q1大曲细菌属中相对丰度较高的是红球菌属(*Rhodococcus*, 30.37%和35.35%),Q3大曲细菌属中相对丰度较高的细菌属是高温放线菌属(*Thermoactinomyces*, 56.99%)。大曲经过富集后,其优势细菌属主要以厚壁菌门(Firmicutes)下的梭菌科(Clostridiaceae)为主。其中,经RCM培养基富集后,富集液中的优势细菌属主要是*Clostridium_sensu_stricto_18* (2.19%~63.04%)、芽孢杆菌属(*Bacillus*, 4.27%~17.15%)、泰式菌属(*Tissierellales*, 11.36%~14.50%)、柄杆菌属(*Caldicoprobacter*, 0.03%~16.00%)、己酸菌属(*Caproiciproducens*, 0.02%~10.11%)、真杆菌属(*Eubacterium*, 2.47%~7.72%)、斯波拉纳菌属(*Sporanaerobacter*, 0%~4.66%)、嗜热脂肪芽孢杆菌属(*Tepidimicrobium*, 2.09%~3.51%)、*Clostridium_sensu_stricto_1* (0.97%~2.91%)等。经mCGM-乳酸培养基富集后,富集液中的优势细菌属主要是*Clostridium_sensu_stricto_18* (4.92%~21.63%)、斯波拉纳菌属(*Sporanaerobacter*, 14.15%~43.03%)、芽孢杆菌属(*Bacillus*, 3.42%~12.5%)、链球菌属(*Caldicoprobacter*, 2.86%~7.07%)、泰式菌属(*Tissierellales*, 4.87%~15.34%)、*Clostridium_sensu_stricto_1* (2.01%~17.36%)、真杆菌群(*Eubacterium_fissicatena_group*, 1.46%~15.82%)、肠球菌属(*Enterococcus*, 1.01%~18.17%)、己酸菌属(*Caproiciproducens*, 2.19%~8.17%)、*Clostridium_sensu_stricto_15*, 3.54%~7.65%)、未分类的毛螺菌属(*unclassified_f_lachnospiraceae*, 2.43%~7.67%)等。

表 1 大曲及其富集液菌群 α 多样性参数

Table 1 The α diversity parameters of bacterial community in Daqu and its enriched liquid

样品	OTU 数目	有效序列数	Ace 指数	Chao 指数	Shannon 指数	Simpson 指数	Coverage
Q1	235	24 143	245.61	237.32	2.61	0.18	0.996 4
Q2	208	31 382	207.72	215.56	2.82	0.13	0.997 0
Q3	228	23 551	237.44	227.32	3.03	0.11	0.997 0
Q4	289	25 384	326.94	312.12	2.81	0.16	0.993 9
RQ1	98	12 988	98.91	98.35	2.53	0.15	0.999 7
RQ2	49	19 553	56.51	51.51	1.47	0.42	0.999 2
RQ3	72	20 116	73.17	72.50	1.75	0.42	0.999 2
RQ4	156	18 807	162.82	159.75	2.69	0.16	0.998 2
mQ1	236	20 317	241.66	236.69	3.33	0.07	0.997 4
mQ2	77	21 308	73.14	72.01	2.59	0.11	0.999 2
mQ3	109	21 139	121.83	120.24	2.99	0.09	0.998 2
mQ4	227	16 124	233.89	228.42	3.16	0.11	0.998 3

注：样品名称首字母为 m 的表示 mCGM- 乳酸培养基富集液样品，样品名称首字母为 R 的表示 RCM 培养基富集液样品，下同。



图 5 大曲及其富集液细菌群落结构组成

Fig.5 Composition of bacterial community structure of Daqu and its enrichment liquid

对比四种川内不同地区中高温大曲在富集前后的细菌微生物组成可以发现，富集后大曲的种群变化较大。富集前，大曲中优势细菌属主要集中在放线菌门（Actinobacteriota）、厚壁菌门（Firmicutes）和变形菌门（Proteobacteria）等，在 4 种大曲中发现的可能优势己酸菌除 Q4 大曲中的 *Clostridium_sensu_stricto_18*（10.87%）和 Q2 大曲中的 *Caproiciproducens*（3.48%）、*Clostridium_sensu_stricto_12*（1.17%）外，在其它大曲中没有发现，其原因可能是己酸菌群含量较低，被归为了 Others 类别中。因此需要通过对比大曲进行富集以提高其中潜在的己酸菌含量来比较不同中高温大曲产己酸菌群结构差异；经过两种培养基富集后，大曲潜在己酸菌群的多样性增加，包括 *Clostridium_sensu_stricto_18*、*Caproiciproducens*、*Clostridium_sensu_stricto_15*、*Clostridium_sensu_stricto_12*、*Clostridium_sensu_stricto_1*、*Clostridium_sensu_stricto_10*、*Clostridium_sensu_stricto_7*。它们除 *Caproiciproducens* 外都属于严格意义上的梭菌，推测可能是大曲中的己酸菌。其中 *Caproiciproducens*、*Clostridium_sensu_stricto_18*、*Clostridium_sensu_stricto_12* 常见于窖泥和酒醅中，是窖泥和酒醅重要的产己酸功能菌^[27,28]。*Clostridium_sensu_stricto_12* 不仅能将乳酸转化为己酸，还能促进各种挥发性化合物的形成，其与己酸、丁酸和 2,3-丁二醇等呈显著正相关^[29]。对比不同大曲富集液的细菌微生物群落结构，可以看到，在可能的己酸菌群中，Q2 大曲经培养富集后，相对丰度大于 5% 的细菌属有 *Clostridium_sensu_stricto_1*、*Caproiciproducens*、*Clostridium_sensu_stricto_18*、

sensu_stricto_15、*Clostridium_sensu_stricto_12*、*Clostridium_sensu_stricto_1*、*Clostridium_sensu_stricto_10*、*Clostridium_sensu_stricto_7*。它们除 *Caproiciproducens* 外都属于严格意义上的梭菌，推测可能是大曲中的己酸菌。其中 *Caproiciproducens*、*Clostridium_sensu_stricto_18*、*Clostridium_sensu_stricto_12* 常见于窖泥和酒醅中，是窖泥和酒醅重要的产己酸功能菌^[27,28]。*Clostridium_sensu_stricto_12* 不仅能将乳酸转化为己酸，还能促进各种挥发性化合物的形成，其与己酸、丁酸和 2,3-丁二醇等呈显著正相关^[29]。对比不同大曲富集液的细菌微生物群落结构，可以看到，在可能的己酸菌群中，Q2 大曲经培养富集后，相对丰度大于 5% 的细菌属有 *Clostridium_sensu_stricto_1*、*Caproiciproducens*、*Clostridium_sensu_stricto_18*、

其可能为 Q2 大曲中的主要已酸菌；同理，Q4 大曲中以 *Clostridium_sensu_stricto_18* 和 *Clostridium_sensu_stricto_1*，Q3 大曲中以 *Clostridium_sensu_stricto_18* 和 *Caproiciproducens*，Q1 大曲中以 *Clostridium_sensu_stricto_18* 和 *Clostridium_sensu_stricto_15* 为主要的已酸菌。从总体上看，经过 RCM 培养基富集后，大曲中的已酸菌群丰度和多样性比 mCGM- 乳酸培养基富集的已酸菌群丰度高。

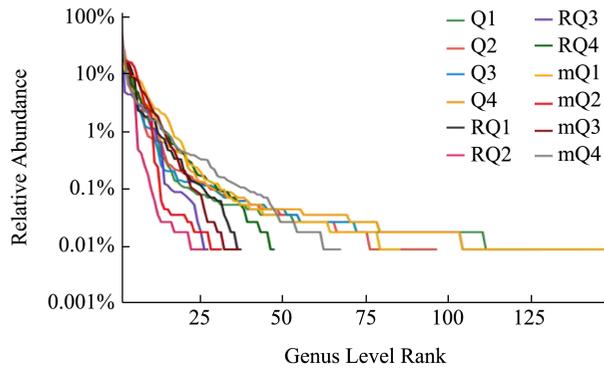


图 6 大曲及其富集液丰度等级曲线图

Fig.6 Rank-Abundance curves of Daqu and its enrichment liquid

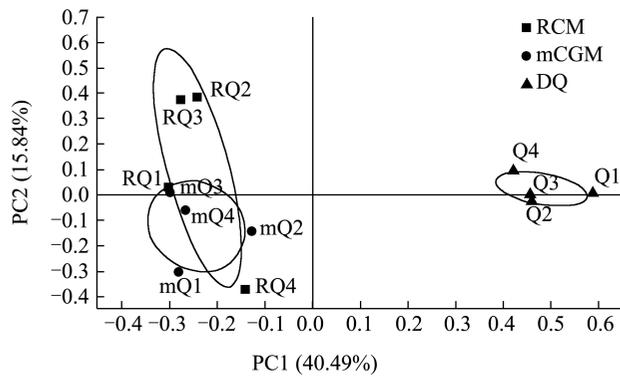


图 7 大曲及其富集液主坐标分析图

Fig.7 Principal coordinate analysis diagram of Daqu and its enrichment liquid

丰度等级曲线 (Rank-Abundance Curves) 能够分析样本的物种丰度和物种均度。如图 6 所示，4 种大曲对比 8 种大曲富集液，丰度等级曲线跨度较大且平缓，说明富集前物种均度和物种丰度都较高，而富集后有所降低。为了更直观地描述出各个样本之间的差异性和相似性，基于属水平上对大曲样品及其大曲发酵液中的细菌微生物进行主坐标分析，如图 7 所示，Q2、Q3 距离很近，Q1、Q4 距离较远，说明 Q2 和 Q3 在细菌群落组成上相似性较高，而与 Q1、Q4 两种大曲样品的细菌群落组成差异性较大。

4 种大曲经富集后，RCM 培养基和 mCGM- 乳酸培养基富集的微生物群落置信椭圆均远离了原始大曲样品微生物群落所构成的置信椭圆，说明富集前后大曲细菌微生物群落结构差异较大。RCM 培养基富集后，RQ2 与 RQ3 距离较近，同时与 RQ1、RQ4 相隔较远，经 mCGM- 乳酸培养基富集后，mQ4 和 mQ3 距离相近，而与 mQ1 和 mQ2 距离较远，主坐标分析结果表明，不同的培养基对大曲进行富集后，得到的大曲富集液在细菌微生物群落结构上具有一定的差异性。

2.3.3 大曲富集液中细菌微生物物种组成分析

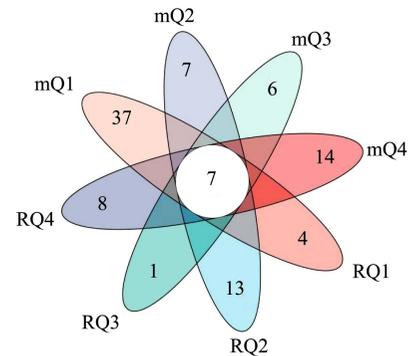


图 8 大曲富集液属水平细菌 Venn 图

Fig.8 Venn diagram of Daqu enrichment liquid genus level bacteria

为统计不同地区大曲经富集后细菌微生物的共有物种与特有物种，在属水平上用 Venn 图对大曲富集后的细菌群落进行分析。如图 8 所示，不同的颜色代表不同地区和不同培养基条件下的大曲富集液细菌属，重叠部分表示共有的菌属，未重叠部分表示特有的菌属，数字表示对应的数目。可以发现，所有的大曲富集液总共有 92 种细菌属，它们共同拥有 7 个细菌属，总的丰度占比为 11.59%~83.89%，其中为优势细菌属的有 *Clostridium_sensu_stricto_18* (2.19%~63.04%)、*Bacillus* (3.42%~17.15%)、*Enterococcus* (0.05%~18.17%)、*Clostridium_sensu_stricto_1* (0.31%~17.37%)。由 mCGM- 乳酸培养基富集的大曲富集液独有优势细菌属仅有 *Rummeliibacillus* (0.31%~17.37%)，而由 RCM 培养基富集的大曲富集液独有优势细菌属仅有 *Lachnoclostridium* (0.31%~17.37%)。

3 结论

通过单因素试验，中高温大曲在 RCM 培养基和 mCGM- 乳酸培养基中经 37 °C 培养 24 d 后已酸

产量最高,富集效果最好。同时富集的结果表明中高温大曲中存在己酸菌群,通过在RCM培养基和mCGM-乳酸培养基的培养能够实现中高温大曲己酸菌群的富集和扩大,大曲中优势细菌属主要集中在放线菌门(Actinobacteriota)、厚壁菌门(Firmicutes)和变形菌门(Proteobacteria)等,经富集后,富集液中的优势细菌属主要集中在梭菌科(Clostridiaceae)中,且不同的大曲己酸菌群组成存在一定的差异性。从总体上看,经过RCM培养基富集后,大曲中的己酸菌群丰度和多样性比mCGM-乳酸培养基富集的己酸菌群丰度高。中高温大曲用曲量大,是浓香型白酒酿造过程中有益微生物的重要来源,分析中高温大曲中的己酸菌群组成,研究结果可为大曲中己酸菌的定向研究提供理论依据。

参考文献

- [1] WEI Y, ZOU W, SHEN C H, et al. Basic flavor types and component characteristics of Chinese traditional liquors: A review [J]. *Journal of Food Science*, 2020, 85(12): 4096-4107.
- [2] 侯雅馨,王俊山,武亚帅,等.浓香型白酒微量成分的研究进展[J].*食品研究与开发*,2022,43(20):194-205.
- [3] 赵晨婕,刘念,王超凯,等.窖泥高产己酸菌的分离筛选及发酵性能测试[J].*中国酿造*,2020,39(1):114-118.
- [4] 张晓宇,郭子贤,吕育财,等.浓香型白酒生态系统中己酸菌研究进展[J].*食品与发酵工业*,2021,47(12):302-308.
- [5] SPIRITO C M, RICHTE R H, RABAE Y K, et al. Chain elongation in anaerobic reactor microbiomes to recover resources from waste [J]. *Current Opinion in Biotechnology*, 2014, 27: 115-22.
- [6] ZHU X, ZHOU Y, WANG Y, et al. Production of high-concentration n-caproic acid from lactate through fermentation using a newly isolated *Ruminococcaceae* bacterium CPB6 [J]. *Biotechnology for Biofuels*, 2017, 10: 1-12.
- [7] 唐贤华,黄睿,王思思,等.浓香型白酒窖泥微生物研究综述[J].*酿酒*,2019,46(2):12-14.
- [8] WANG X, DU H, XU Y. Source tracking of prokaryotic communities in fermented grain of Chinese strong-flavor liquor [J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2017, 244: 27-35.
- [9] ZHANG H, MENG Y, WANG Y, et al. Prokaryotic communities in multidimensional bottom-pit-mud from old and young pits used for the production of Chinese Strong-Flavor Baijiu [J]. *Food Chemistry*, 2020, 312: 126084.
- [10] 任聪,辜杨,杜海,等.基于新老窖泥的微生物菌群结构判定浓香型白酒生产中的主体己酸菌[J].*食品与发酵工业*,2018,44(12):8-14.
- [11] 吴玉轩.浓香型白酒窖泥己酸菌丰度分析与应用研究[D].济南:齐鲁工业大学,2023.
- [12] 张惠芳,张婉莹,周索,等.除店老酒窖池中产己酸菌分离鉴定及产酸条件研究[J].*现代食品科技*,2023,39(2):188-196.
- [13] RODDICK F A, BRITZ M L. Production of hexanoic acid by free and immobilised cells of *Megasphaera elsdenii*: Influence of in-situ product removal using ion exchange resin [J]. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 1997, 69(3): 383-391.
- [14] MAROUNEK M, FLIEGROVA K, BARTOS S. Metabolism and some characteristics of ruminal strains of *Megasphaera elsdenii* [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1989, 55(6): 1570-1573.
- [15] TAO Y, WANG X, LI X, et al. The functional potential and active populations of the pit mud microbiome for the production of Chinese strong-flavour liquor [J]. *Microbial Biotechnology*, 2017, 10(6): 1603-1615.
- [16] LIU M, ZHAO K, TANG Y, et al. Analysis of Clostridium cluster I community diversity in pit mud used in manufacture of Chinese Luzhou-flavor liquor [J]. *Food Science and Biotechnology*, 2015, 24(3): 995-1000.
- [17] 周虞.浓香大曲复产前后微生物差异及环境来源解析[D].无锡:江南大学,2023.
- [18] 汪凌旭,易卓林,赵海,等.浓香型大曲菌系、酶系的研究进展[J].*四川轻化工大学学报*,2021,34(5):17-25.
- [19] 张清玫.浓香大曲微生物群落结构解析与功能微生物筛选[D].无锡:江南大学,2022.
- [20] 吴清莲.乙醇和乳酸引导的碳链增长技术生产中链羧酸的研究[D].哈尔滨:哈尔滨工业大学,2019.
- [21] LUO Q C, ZHENG J, ZHAO D, et al. *Clostridium aromativorans* sp. nov., isolated from pit mud used for producing Wuliangye baijiu [J]. *Antonie van Leeuwenhoek International Journal of General and Molecular Microbiology*, 2023, 116(7): 739-748.
- [22] MAO F J, HUANG J, ZHOU R Q, et al. Effects of different Daquon microbial community domestication and metabolites in Nongxiang Baijiu brewing microecosystem [J]. *Frontiers in Microbiology*, 2022, 13: 939904.
- [23] OBERHARDT M A, ZARECKI R, GRONOW S, et al. Harnessing the landscape of microbial culture media to predict new organism-media pairings [J]. *Nature Communications*, 2015, 6: 8493.
- [24] 马鸿志,武文字,于子强,等.微生物合成己酸的基本原理:能量代谢及影响因素[J].*工程科学学报*,2023,45(4):681-692.
- [25] 朱晓军.浓香型白酒窖泥产酸菌群培养及新型己酸合成菌的鉴定与特性分析[D].无锡:江南大学,2018.
- [26] 郭燕.浓香型大曲在黄水厌氧中产酸特性及微生物演替规律研究[D].自贡:四川轻化工大学,2023.
- [27] 陈思恒,宁欣强,唐棠,等.添加不同生物炭对人工窖泥培养微生物群落影响[J].*食品与发酵工业*,2023,49(23):96-104.
- [28] 胡晓龙,冯大鸿,杨雨惠,等.浓香型酒醅中活性梭菌群多样性及其与挥发性有机酸代谢的关联性[J].*食品科学技术学报*,2023,41(5):100-109.
- [29] LIU M K, TANG Y M, GUO X J, et al. Deep sequencing reveals high bacterial diversity and phylogenetic novelty in pit mud from Luzhou Laojiao cellars for Chinese strong-flavor Baijiu [J]. *Food Research International*, 2017, 102: 68-76.