

酱香大曲微生物数量和细菌多样性 在不同制曲条件下的差异

范恩帝, 吴成, 李岭卓, 谢丹, 黄魏, 张健, 尤小龙, 程平言*, 胡峰
(贵州茅台酒厂(集团)习酒有限责任公司, 贵州习水 564622)

摘要: 基于微生物培养技术和高通量测序技术研究了制曲原料和制曲方式对酱香大曲微生物数量、细菌群落结构及其功能基因的影响。研究表明: 制曲原料相较于制曲方式对微生物数量的影响更大, 有机小麦和人工踩曲均有利于细菌和霉菌的生长繁殖; 实验选取的酱香大曲优势细菌门包括厚壁菌门(Firmicutes)、变形菌门(Proteobacteria)、放线菌门(Actinobacteria)、norank_Bacteria, 优势细菌属包括 *Kroppenstedtia*、芽孢杆菌属(*Bacillus*)、不动杆菌属(*Acinetobacter*)、支芽孢杆菌属(*Virgibacillus*)和高温放线菌属(*Thermoactinomyces*)等 16 个属; 在细菌群落调节机制和中心(Hub)微生物方面, 不同制曲条件下生产的酱香大曲有所差异; 就细菌群落多样性和丰度而言, 机械有机大曲和人工普通大曲略优于机械普通大曲, 但机械普通大曲与机械有机大曲较为相似, 与人工普通大曲极为相似; PICRUSt 功能基因预测结果表明, 机械曲和人工曲、普通小麦曲和有机小麦曲在细菌群落功能基因上均存在不同程度的相似性, 但机械曲与人工曲之间更为接近。该研究对比了不同制曲原料和制曲方式条件下酱香大曲的微生物数量、细菌群落结构和细菌功能基因, 对于改善提高贵州酱香型白酒品质具有一定的指导意义。

关键词: 制曲原料; 制曲方式; 酱香大曲; 微生物数量; 细菌多样性; 功能基因

文章编号: 1673-9078(2023)05-62-71

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2023.5.0693

Differences in Microbial Count and Bacterial Diversity in Jiangxiang Daqu under Various Koji-making Conditions

FAN Endi, WU Cheng, LI Lingzhuo, XIE Dan, HUANG Wei, ZHANG Jian, YOU Xiaolong, CHENG Pingyan*, HU Feng

(Kweichow Moutai Brewery (Group) Xijiu Co. Ltd., Xishui 564622, China)

Abstract: Based on microbial culture and high-throughput sequencing, the effects of different koji-making raw materials and methods on microbial count, bacterial community structure, and functional genes in Jiangxiang Daqu were studied. Koji-making raw materials showed a greater impact on microbial count than koji-making methods, and both organic wheat and artificial koji were conducive to the growth and reproduction of bacteria and fungi. The dominant bacterial phyla in Jiangxiang Daqu were Firmicutes, Proteobacteria, Actinobacteria, and norank_Bacteria, whereas the dominant bacterial genera ($n=16$) included *Kroppenstedtia*, *Bacillus*, *Acinetobacter*, *Virgibacillus*, and *Thermoactinomyces*. The regulatory mechanisms of and hub microbes in bacterial communities in Maotai-flavored Daqu produced under different koji-making conditions were different. In terms of bacterial community diversity and abundance, mechanical organic Daqu and artificial common Daqu were slightly better than mechanical ordinary Daqu, although mechanical ordinary Daqu was slightly similar to mechanical organic Daqu and extremely similar to artificial ordinary Daqu. PICRUSt functional gene prediction revealed different degrees of

引文格式:

范恩帝, 吴成, 李岭卓, 等. 酱香大曲微生物数量和细菌多样性在不同制曲条件下的差异[J]. 现代食品科技, 2023, 39(5): 62-71.

FAN Endi, WU Cheng, LI Lingzhuo, et al. Differences in microbial count and bacterial diversity in Jiangxiang Daqu under various koji-making conditions [J]. Modern Food Science and Technology, 2023, 39(5): 62-71.

收稿日期: 2022-05-31

基金项目: 遵义市优秀青年科技创新人才培养项目(遵优青[2019]1号); 贵州省十大千亿级工业(优质烟酒)专项资金项目(黔财工[2019]226号); 贵州省纯粮固态酿造技术工程研究中心建设(黔财建[2019]303号); 贵州省工业和信息化发展专项资金项目(黔财工[2021]165号)

作者简介: 范恩帝(1994), 男, 硕士, 助理工程师, 研究方向: 现代酿造, E-mail: fanendi@foxmail.com

通讯作者: 程平言(1988-), 女, 硕士, 高级工程师, 研究方向: 白酒酿造及产业化推广, E-mail: xjjszx149@sina.com

similarity in the functional genes of bacterial communities between mechanical and artificial koji as well as between common and organic wheat koji, although mechanical and artificial koji were more similar. This study compared the microbial count, bacterial community structure, and bacterial functional genes in Jiangxiang Daqu prepared with different koji-making materials and methods, which has certain guiding significance for improving the quality of Jiangxiang baijiu.

Key words: koji-making raw materials; koji-making methods; Jiangxiang Daqu; microbial count; bacterial diversity; functional genes

白酒是中华民族的瑰宝，种类丰富且风味独特，按照主体香味物质的不同可将其分为浓香型、清香型、酱香型和米香型等十二种香型，其中酱香型白酒因其“四高两长”的特殊生产工艺显得最为繁杂^[1-3]。白酒发酵剂包括大曲、小曲和麸曲，大曲因其产酒风味好而成为白酒生产过程中的主要发酵剂^[4]，可分为高温大曲、中温大曲和低温大曲。在酱香型白酒生产过程中使用的曲药以高温大曲为主，其不仅可以作为白酒发酵的部分原料，还可以提供丰富的酶类（淀粉酶、纤维素酶和蛋白酶等）和微生物（10%~20%的细菌微生物和60%~80%的真菌微生物），因此高温大曲的质量对改善和提高酱香型白酒品质起着关键性作用^[5]。通常来说，大曲中主要存在细菌、酵母菌、丝状真菌和放线菌4种微生物^[4,6]，其中高温大曲含有丰富的细菌微生物，以茅台酒为代表的酱香型白酒大曲细菌微生物主要包括芽孢杆菌、醋酸菌、乳酸杆菌和梭菌，其中芽孢杆菌作为优势细菌微生物^[7]。因此，研究酱香型白酒高温大曲细菌群落结构对深层次探究酱香型白酒酿造机理和形成酱香风味的功能微生物，并进一步提高酱香型白酒品质等方面都具有重要意义。

在高通量测序技术问世前，采用传统方法研究微生物群落结构时，仅能检测到极少数可培养的微生物，不足以完全揭示微生物的实际群落结构^[8]。而高通量测序技术的快速发展则彻底改变了生物学研究，使得对任何感兴趣的生物体进行DNA/RNA测序成为可能，高通量测序技术不仅具有价格低、速度快和测序量大的优点，而且具有高完整性和准确性的特点，因而倍受相关研究人员青睐，使其广泛应用于土壤微生物、食品微生物和临床微生物等的研究^[9-11]。在白酒领域，高通量测序技术也得到了大范围的应用，用于深入研究白酒生产过程中的大曲、窖泥和糟醅等的微生物群落多样性及演替^[8,12,13]。

本文采用传统微生物培养技术结合高通量测序技术探究制曲原料（普通小麦和有机小麦）与制曲方式（人工踩曲和仿生机制）对成品高温大曲中微生物数量及细菌群落结构的影响，以期在微观水平上为实现从制曲方式和制曲原料改善贵州酱香型白酒风味提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

成品粉碎大曲：贵州省某酱香型白酒公司入库储存半年后进行粉碎得到的成品粉碎曲，机械普通曲（JP, JP-1、JP-2、JP-3）是采用机械压曲制成的普通小麦大曲，人工普通曲（RP, RP-1、RP-2、RP-3）是采用人工踩曲制成的普通小麦大曲，机械有机曲（JY, JY-1、JY-2、JY-3）是采用机械压曲制成的有机小麦大曲，每种大曲分别在同一粉碎生产线上取三个平行样，每个平行样取样间隔时间为30 min，不同小麦常规成分含量见表1；酵母浸粉：OXOID；蛋白胨、营养琼脂培养基、孟加拉红培养基：北京奥博星生物技术有限责任公司；葡萄糖、磷酸二氢钾：国药集团化学试剂有限公司；氯化钾、氯化钙、氯化铁、硫酸镁、硫酸锰：天津大茂化学试剂厂。

表1 小麦常规成分质量分数（%）

Table 1 Contents of conventional ingredients in wheat

成分	普通小麦	有机小麦
淀粉	59.73±0.97	59.27±0.42
蛋白质	13.63±0.29	13.72±0.45
灰分	0.55±0.02	0.56±0.03
水分	11.17±0.32	11.40±0.30

1.2 仪器与设备

ZQPL-200型全温震荡培养箱，天津市莱玻特瑞仪器设备有限公司；DW-30L278海尔-20℃低温保藏箱，青岛海尔生物医疗股份有限公司；AWL-1001-P超纯水器，艾科浦公司；DHG-9075A型电热恒温鼓风干燥箱，上海一恒科学仪器有限公司；SW-CJ-2F无菌操作台，苏州净化设备有限公司；LRH-250生化培养箱，上海一恒科学仪器有限公司；CL-32L高压蒸汽灭菌锅，KAGOSHIMA SEISAKUSYO INC；NIRS™ DS2500 L近红外光谱分析仪，福斯华（北京）科贸有限公司。

1.3 方法

1.3.1 小麦理化及微生物测定

小麦理化直接采用近红外光谱分析仪进行测定；高温大曲中的细菌、酵母菌和霉菌数量均使用稀释涂布平板法进行测定，其中细菌、酵母菌、霉菌分别采用营养琼脂培养基、WL 培养基、孟加拉红培养基进行分离培养，并基于实验室菌种库从宏观形态和微观形态对微生物进行种类划分^[14]。

1.3.2 酱香大曲中 DNA 提取、PCR 扩增和测序

酱香白酒高温大曲样品置于灭菌后的 15 mL 离心管，然后将其低温保存送至上海生工生物工程股份有限公司进行测序，采用 E.Z.N.A™ Mag-Bind Soil DNA Kit 提取试剂盒对成品粉碎曲微生物基因进行提取。细菌扩增区域选择为 16SV3-V4，扩增引物为 Nobar_341F (CCTACGGGNGGCWGCAG) 和 Nobar_805R (GACTACHVGGGTATCTAATCC)，第一轮扩增按照表 2 中反应体系进行配制，然后将已配制的 PCR 管置于 PCR 仪中进行扩增，PCR 仪程序设置如下：94 °C，3 min→(94 °C，30 s→45 °C，20 s→65 °C，30 s)₅→(94 °C，20 s→55 °C，20 s→72 °C，30 s)₂₀→72 °C，5 min→10 °C，∞。然后进行第二轮扩增，引入 Illumina 桥式 PCR 兼容引物，按照表 3 中反应体系进行配制，将已配制的 PCR 管置于 PCR 仪中进行扩增，PCR 仪程序设置如下：95 °C，3 min→(94 °C，20 s→55 °C，20 s→72 °C，30 s)₅→72 °C，5 min→10 °C，∞。

表 2 第一轮扩增 PCR 反应体系

Table 2 The first round of amplification PCR reaction system

组分	体积/ μL
2×Hieff® Robust PCR Master Mix	15.00
Bar-PCR primer F	1.00
Primer R	1.00
PCR products	0.50~3.00
H ₂ O	9.00~12.00
Total volum	30.00

表 3 第二轮扩增 PCR 反应体系

Table 3 The second round of amplification PCR reaction system

组分	体积/ μL
2×Hieff® Robust PCR Master Mix	15.00
Primer F	1.00
Index-PCR Primer R	1.00
PCR products	0.50~3.00
H ₂ O	9.00~12.00
Total volum	30.00

1.3.3 高通量测序数据处理与分析

采用 Illumina Miseq 测序系统，对酱香白酒高温大曲样品中细菌的 16SV3-V4 区域基因序列进行了测

序，首先根据重叠关系 (Overlap) 对测序获得的样品序列进行拼接，然后对已拼接序列质量进行质控 (质控即去除条形码 (Barcode)、引物和一些质量不高的序列后的序列长度，以及该长度 reads 数目) 和筛选，测序获得的样品序列在 97% 一致性水平上进行 OTU 聚类 (ASV 去噪) 分析和物种分类学分析。根据 OTU 聚类 (ASV 降噪) 的结果，对 OTU (ASV) 进行了多项指标的分析，并对测序深度进行了检测；利用分类学资料，可以在多种分类水平上对微生物群落结构进行统计分析处理。通过以上分析，可以采用 Beta 多样性分析、分组检验、差异显著性检验等方法，对多种样本的种群构成和演化特征进行分析。本研究测序数据比对基于以下数据库：RDP 16S 数据库 (<http://rdp.cme.msu.edu/misc/resources.jsp>)、Silva 16S 数据库 (<http://www.arb-silva.de/>) 和 NCBI 16S 数据库 (<http://ncbi.nlm.nih.gov/>)。

2 结果与分析

2.1 制曲原料和制曲方式对酱香大曲微生物数量的影响

酱香型白酒生产过程中的细菌和真菌主要来自于酱香大曲，而酱香大曲中的这些细菌和真菌则主要来自于添加的母曲和大曲生产环境等，在这其中真菌群落主要来自于生产环境 (主要包括工具、空气、人员接触等)，大曲中的细菌群落则大部分来自于原料^[15,16]，人工踩曲相较于机械制曲可以为大曲增加引入微生物的几率，丰富大曲微生物种类，同时人工踩曲制作的曲块更符合曲坯压制标准：“四周紧，中间略松，表面呈龟背型，不松散断裂，不缺边掉角，厚度统一”，更有利于微生物的生长繁殖^[17]。另外普通小麦和有机小麦在蛋白质、淀粉、植酸、多酚等物质的含量或结构都有所差异^[18]，也会影响微生物的生长繁殖。不同制曲原料和制曲方式生产的酱香大曲微生物数量如表 4 所示。

从表 4 数据可以看出制曲原料对于成品大曲酵母数量影响较小，主要原因可能是制曲过程的中挺期温度过高致使大部分酵母死亡，另外则可能是由于制曲原料对于酵母生长繁殖影响较小。但是有机小麦制作的曲块更有利于细菌和霉菌生长繁殖，尤其是细菌，其原因可能是有机小麦中的淀粉和蛋白质等物质更易被微生物利用^[18]。另外制曲方式对于成品大曲酵母数量影响也较小，原因应类似于制曲原料对酵母数量影响小的原因，就细菌和霉菌数量而言，人工踩曲方式

则略优于机械制曲方式，主要是由于人工踩曲制作的曲块相对而言更符合曲坯压制标准，但是另一方面也侧面反映了机械制曲的潜力，在保证机制曲微生物数

量和人工踩曲接近的同时，大幅提高了生产速度，并降低了人工成本。

表 4 酱香大曲微生物数量

Table 4 Microbial quantity in Jiangxiang Daqu

大曲类型	细菌数量/(CFU/g)	酵母数量/(CFU/g)	霉菌数量/(CFU/g)
机械普通大曲-1 (JP-1)	3.50×10 ⁵	20.00	3.40×10 ³
JP-2	2.90×10 ⁵	30.00	2.50×10 ³
JP-3	3.10×10 ⁵	0.00	3.00×10 ³
人工普通大曲-1 (RP-1)	4.30×10 ⁵	70.00	3.80×10 ³
RP-2	3.60×10 ⁵	30.00	3.60×10 ³
RP-3	3.00×10 ⁵	90.00	4.90×10 ³
机械有机大曲-1(JY-1)	(1.25×10 ⁶) ^b	40.00	(7.10×10 ³) ^a
JY-2	(9.10×10 ⁵) ^b	20.00	(4.10×10 ³) ^a
JY-3	(1.47×10 ⁶) ^b	0.00	(5.40×10 ³) ^a

注: a表示相对于机械普通大曲组显著性 $P \leq 0.05$; b表示相对于机械普通大曲组显著性 $P \leq 0.01$ 。

表 5 各样本有效序列数据统计

Table 5 Statistics of valid sequence data for each sample

样本名称	有效序列数	平均长度	最短序列长度	最长序列长度
JP-1	61 393.00	427.88	358.00	465.00
JP-2	53 278.00	428.66	355.00	473.00
JP-3	73 571.00	427.42	354.00	463.00
RP-1	53 114.00	428.43	368.00	466.00
RP-2	69 536.00	428.83	350.00	449.00
RP-3	48 630.00	428.91	375.00	456.00
JY-1	45 552.00	428.75	368.00	433.00
JY-2	56 233.00	428.88	353.00	469.00
JY-3	56 234.00	429.01	374.00	466.00

2.2 测序数据统计与 OTU 分析

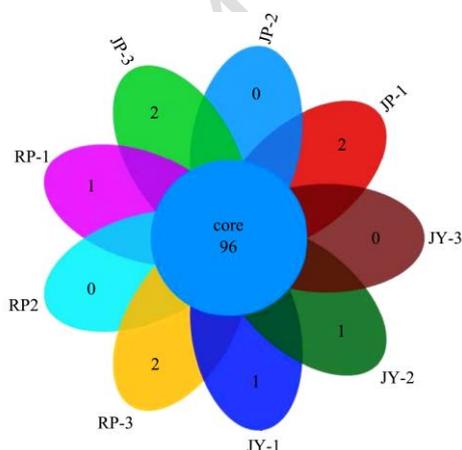


图 1 酱香大曲样品基于 OTU 水平的 Venn 图

Fig.1 Venn diagram based on OTU of Jiangxiang Daqu samples

9 个酱香型白酒高温大曲样品经高通量测序获得的有效序列数据统计见表 5，在 97% 相似水平下对样

品序列进行生物信息统计分析。

韦恩 (Venn) 图可用于反映不同事物之间的逻辑关系，可对参与实验的样本间共有的 OTU 数目及独有的 OTU 数目进行分别统计，进而较为直观地展现出各实验样本在 OTU 水平上的相似程度^[19]。图 1 为各酱香大曲样品有效序列经 OTU 聚类分析和物种分类分析得到的 Venn 图。从图 1 可以看出，JP、RP 和 JY 组成品酱香大曲共有的物种数为 96 个，各组独占的 OTU 数目均极少甚至没有，说明各组样品在 OTU 水平上极为相似。

2.3 Alpha 多样性分析

对得到的样品有效序列进行 Alpha 多样性分析，可以帮助深入了解酱香大曲样品的细菌群落多样性^[20]。在 Alpha 多样性指标中的 Coverage 指数数值表示样本序列覆盖率，样品序列的 Coverage 指数数值大于 98%，则可说明实验测序结果能够真实反映微生物

群落微生物的多样性^[21]。在 Alpha 多样性指标中的 Shannon、Chao1 和 ACE 指数可用于表示微生物物种丰富度和多样性^[22]，其中 Shannon 指数主要用于表示物种多样性，Chao1 指数和 ACE 指数则用于表示物种丰富度，Shannon 指数的数值与群落丰度的均匀性成正比^[23,24]，而 ACE 和 Chao1 指数的数值则与菌落丰富度成正比^[25]。

通过多次计算样本中若干数量序列对应的 Alpha 多样性指数，然后将样品序列数量作为横坐标，将相应的 Alpha 多样性指数值作为纵坐标，并将这些点连接而成的平滑曲线即为稀释曲线。根据稀释曲线是否达到平缓可以判断本次测序数据量是否足够，当稀释曲线趋于平缓说明测序数据足够有效反映样品的主要微生物群落结构^[15,26]。从图 2 可以看出，各酱香大曲样品的 OTU 数目稀释曲线呈现类似于开口向下抛物线的形状，随着测序样品数量增加，稀释曲线斜率逐渐减小，逐渐趋于平缓，此外 Shannon 指数稀释曲线也逐渐趋于平缓，两者共同表明了目前测序数据量已经能够充分反映样品真实情况。

从表 6 数据可以看出，本次实验的大曲样品的 Coverage 指数都为 100%，均大于 98%，说明本次实验所有测序结果均可以真实反映样本细菌群落的多样性。就 Shannon 指数而言，RP 组相较于 JP 组数值更为稳定且数值较大，说明 RP 组较 JP 组在细菌群落丰度上表现得更加均匀，反映出人工踩曲对物种多样性有增益效果，而机械曲在物种多样性方面也有较好表现，甚至最大值高于人工曲，只是机械曲在稳定性上有所欠缺；另外 JY 组相较于 JP 组数值也更为稳定，说明普通曲块质量在稳定性不如有机曲块，但其最大值却远高于有机曲块，这一现象可能是由于制作大曲的普通小麦种类并不单一且混合不均匀，后期可研究用各单一普通小麦制曲进行对比，然后选出最有利于细菌多样性的普通小麦，这样既可以保证酱香大曲细

菌多样性，又能大大降低生产成本。另外从 ACE 和 Chao1 指数可以看出，RP 组与 JP 组相比，数值偏小但更为稳定，说明就细菌菌落丰富度而言，机械曲上限更大，而人工曲相对更加稳定，侧面说明不断改进机械压曲工艺提高其制曲稳定性，有潜力逐步取代人工踩曲；JY 组最大值和最小值均大于 JP 组，说明 JY 组细菌群落更加丰富，也说明了有机小麦有利于提高酱香大曲细菌群落丰富度，另外 JP 组的 ACE 和 Chao1 指数波动较大，但其最大值也较为突出，更加证实了制作大曲的普通小麦种类并不单一且混合不均匀。

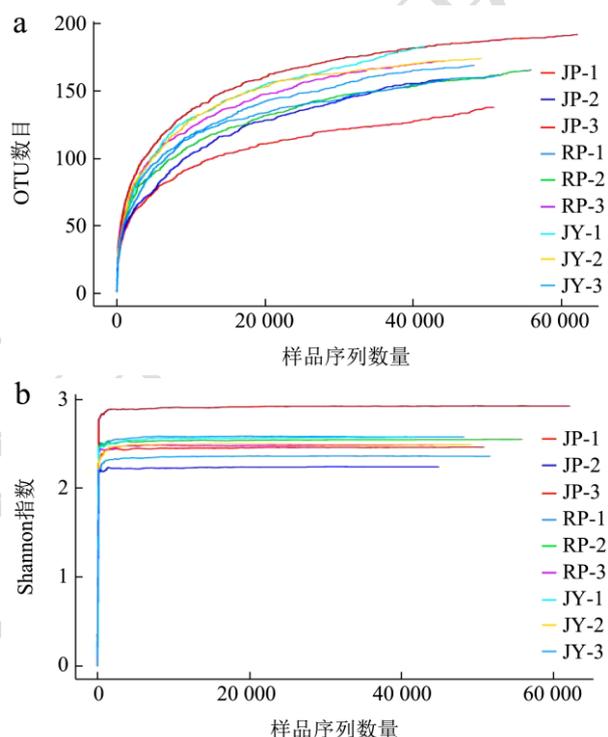


图 2 细菌高通量测序稀释曲线

Fig.2 Dilution curve of bacterial high-throughput sequencing

注：(a) 细菌 OTU 数目稀释曲线；(b) 细菌 Shannon 指数稀释曲线。

表 6 Alpha 多样性指数统计表

Table 6 Statistical table of Alpha diversity index

样本名称	Shannon 指数	Chao1 指数	ACE 指数	Coverage 指数/%
JP-1	2.46	173.77	166.87	1.00
JP-2	2.24	192.30	189.43	1.00
JP-3	2.92	204.67	201.86	1.00
RP-1	2.58	192.62	185.94	1.00
RP-2	2.55	180.13	184.80	1.00
RP-3	2.49	189.11	189.49	1.00
JY-1	2.57	218.00	212.96	1.00
JY-2	2.49	184.69	183.72	1.00
JY-3	2.36	206.00	189.21	1.00

2.4 细菌群落结构分析

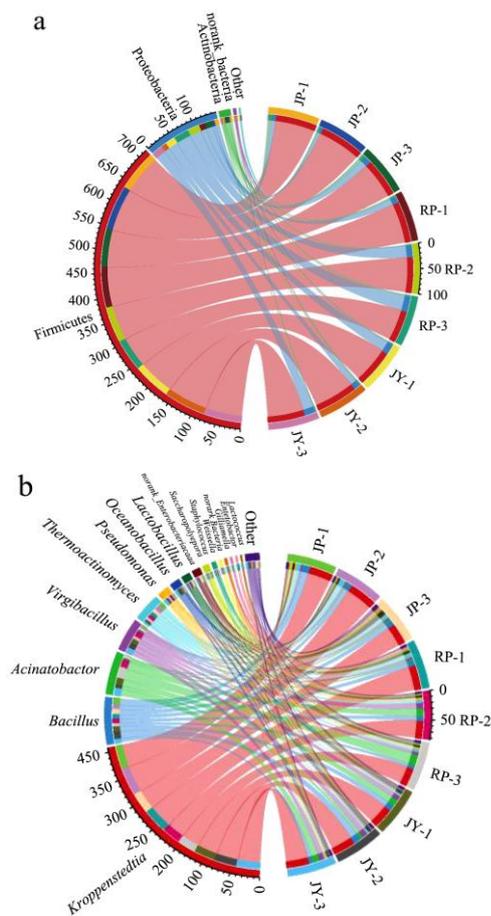


图3 酱香大曲细菌群落共线性关系图

Fig.3 Collinear relationship of bacterial community in Jiangxiang Daqu

注：(a) 门水平酱香大曲细菌群落共线性关系图，(b) 属水平酱香大曲细菌群落共线性关系图。共线性关系图中右半圆用以表示不同物种在各个样品中的相对比例，左半圆则可用以直观表示不同物种中各个样品的分布差异性。共线性关系图圆环包括两层彩色圈，圆环外层定义为第一彩色圈，圆环内层定义为第二彩色圈。在共线性关系图右半圆中，第一彩色圈中不同的颜色表示不同的样品，第二彩色圈中不同颜色表示各个物种在相应样品中的丰度组成；在共线性关系图左半圆中，第一彩色圈中不同的颜色表示不同的物种，第二彩色圈表示相应物种在不同样品中的分布情况；圆环内部的彩色条带一端连接右半圆，另一端连接左半圆，条带宽度分别表示该物种在相应样本中的相对比例和该样本在相应物种中的分布状况，圆环外刻度及数值可量化表示各个样品中不同物种的丰度组成情况和各个物种在不同样本中的分布比例情况。

为了进一步探究制曲原料和制曲方式对酱香大曲细菌群落结构的影响，本研究从门水平上和属水平上对酱香大曲细菌的群落结构进行了统计分析。结果见图3，分析过程中将在各实验样本中相对丰度占比均

小于1%的物种归属于 Others, 其余的则作为优势物种进行分析。

从图3可以看出本次实验选取的酱香大曲细菌归属于5个门的17个属，优势细菌门包括厚壁菌门(Firmicutes)、变形菌门(Proteobacteria)、放线菌门(Actinobacteria)、*norank_Bacteria*，在门水平上和茅台大曲细菌群落结构较为相似，以厚壁菌门和放线菌门等细菌作为主要细菌^[27]；优势细菌属包括 *Kroppenstedtia*、芽孢杆菌属(*Bacillus*)、不动杆菌属(*Acinetobacter*)、支芽孢杆菌属(*Virgibacillus*)、高温放线菌属(*Thermoactinomyces*)、假单胞菌属(*Pseudomonas*)、海洋芽孢杆菌属(*Oceanobacillus*)、乳(酸)杆菌属(*Lactobacillus*)、*norank_Enterobacteriaceae*、糖多孢菌属(*Saccharopolyspora*)、葡萄球菌属(*Staphylococcus*)、魏斯氏菌属(*Weissella*)、*norank_Bacteria*、*Gilliamella*、肠杆菌属(*Enterobacteriaceae*)、乳球菌属(*Lactococcus*)，在属水平上和已有研究的其它酱香大曲细菌群落类似，*Kroppenstedtia*、芽孢杆菌属和高温放线菌属等细菌占据主导地位^[28]。

2.5 相关性网络分析

为了进一步探究不同制曲条件下生产的酱香大曲细菌群落结构关系，以16个优势细菌属为研究对象，分别对各酱香大曲中细菌属间的 Spearman 相关性系数进行计算，并根据计算所得的 Spearman 相关性系数绘制各酱香大曲细菌群落结构的相关性网络图，结果如图4所示。

从图4可以看出，JP组酱香大曲细菌群落相关性网络图包含65个正相关关系，55个负相关关系，RP组酱香大曲细菌群落相关性网络图包含70个正相关关系，50个负相关关系，JY组酱香大曲细菌群落相关性网络图包含60个正相关关系，60个负相关关系。综上所述，RP组酱香大曲较多细菌属之间呈正相关调节机制，而JP组酱香大曲和JY组酱香大曲细菌属之间呈正相关调节机制和负相关调节机制的数量相近。

对维持群落结构有重要作用的关键微生物称为中心(Hub)微生物，与其它相互微生物联系紧密，其自身发生改变会使得整个群落发生较大的连锁效应^[29]。本研究将 Hub 微生物定义为与其它至少5个属微生物相关性大于0.9，在此标准下，JP组酱香大曲存在2个正相关性 Hub 微生物(乳(酸)杆菌属和 *Gilliamella*)，不存在负相关性 Hub 微生物；RP组酱香大曲存在5个正相关性 Hub 微生物，分别为 *Kroppenstedtia*、糖多孢菌属、*Gilliamella*、乳球菌属

和肠杆菌属, 2 个负相关性 Hub 微生物, 包括不动杆菌属和假单胞菌属; JY 组酱香大曲存在 2 个负相关性 Hub 微生物, 分别为假单胞菌属和魏斯氏菌属, 不存在正相关性 Hub 微生物。

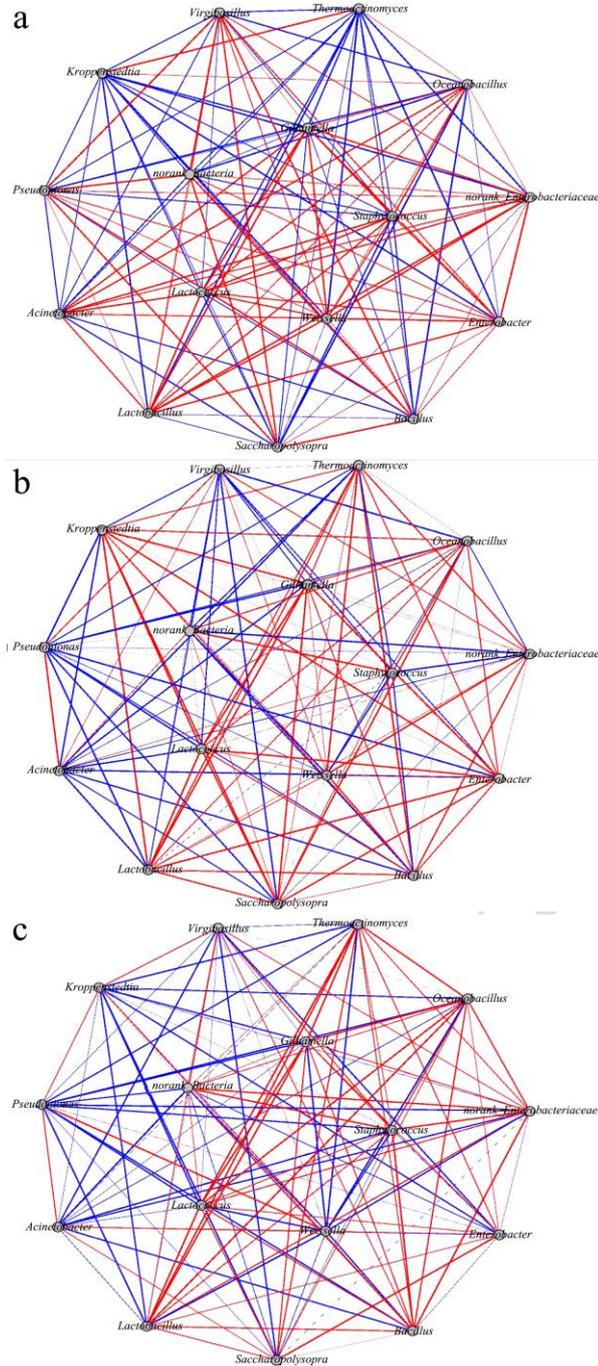


图 4 酱香大曲细菌群落相关性网络图

Fig.4 Correlation network diagram of bacterial community in Jiangxiang Daqu

注: (a) JP 组酱香大曲相关性网络图, (b) RP 组酱香大曲相关性网络图, (c) JY 组酱香大曲相关性网络图。细菌属之间的红色连线表示两者呈正相关关系, 蓝色连线表示两者呈负相关关系, 线条粗细表示两者之间相关性的强弱, 线条越粗表明两者相关性越大。

2.6 Beta 多样性分析

Beta 多样性是指在给定区域内采集样品之间物种组成的差异性^[30], 常用的方法包括主成分分析 (Principal Component Analysis, PCA 分析) 和相似性分析等。相关性分析可以比较直接地反映不同样本间的相关程度, 相关系数越接近 1, 表明样本之间的相似度越高。

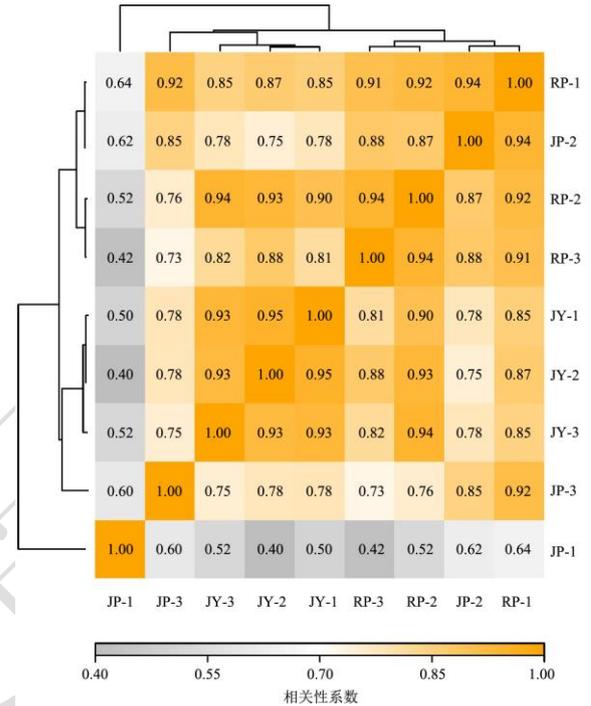


图 5 属水平酱香大曲细菌群落相关性聚类热图

Fig.5 Correlation cluster heatmap of the bacterial community genera among Jiangxiang Daqu

图 5 是从属水平上对各酱香大曲细菌群落相关性分析得到的结果。从图 5 可以看出 JP 组与 RP 组相关性较高, 其中 JP-2 与 RP 组相关性系数分别达到 0.94、0.87 和 0.88, JP-3 与 RP 组相关性系数分别达到 0.92、0.76 和 0.73, 结合 JP 组与 RP 组的聚类分析, 可以认为两组间的细菌群落结构极为相似, 说明就细菌种类数量而言, 机制曲可以达到和人工曲极为接近的水平。而 JP 组与 JY 组相关性系数相对较低, 但其中 JP-2 与 JY 组的相关性分别为 0.78、0.75 和 0.78, JP-3 与 JY 组的相关性系数也分别达到了 0.78、0.78 和 0.75, 表明普通小麦曲与有机小麦曲间的细菌群落结构也较为相似。

2.7 酱香大曲细菌群落功能预测

KEGG 数据库是一个整合了大量基因、基因功能、代谢途径等信息的生物信息学工具, 对从分子水平上探究细胞等生物系统的代谢途径和功能作用等方面有

较大助益^[31]。PICRUSt 软件是一款可以根据测序结果来预测测序结果以外的基因内容和宏基因组的软件^[32]。基于测序结果,本研究通过 PICRUSt 软件对酱

香大曲中的细菌群落进行功能预测,并结合 KEGG 数据库对差异表达基因进行基因功能注释,样品序列丰度表示为 2 的多次幂形式,结果如图 6 所示。

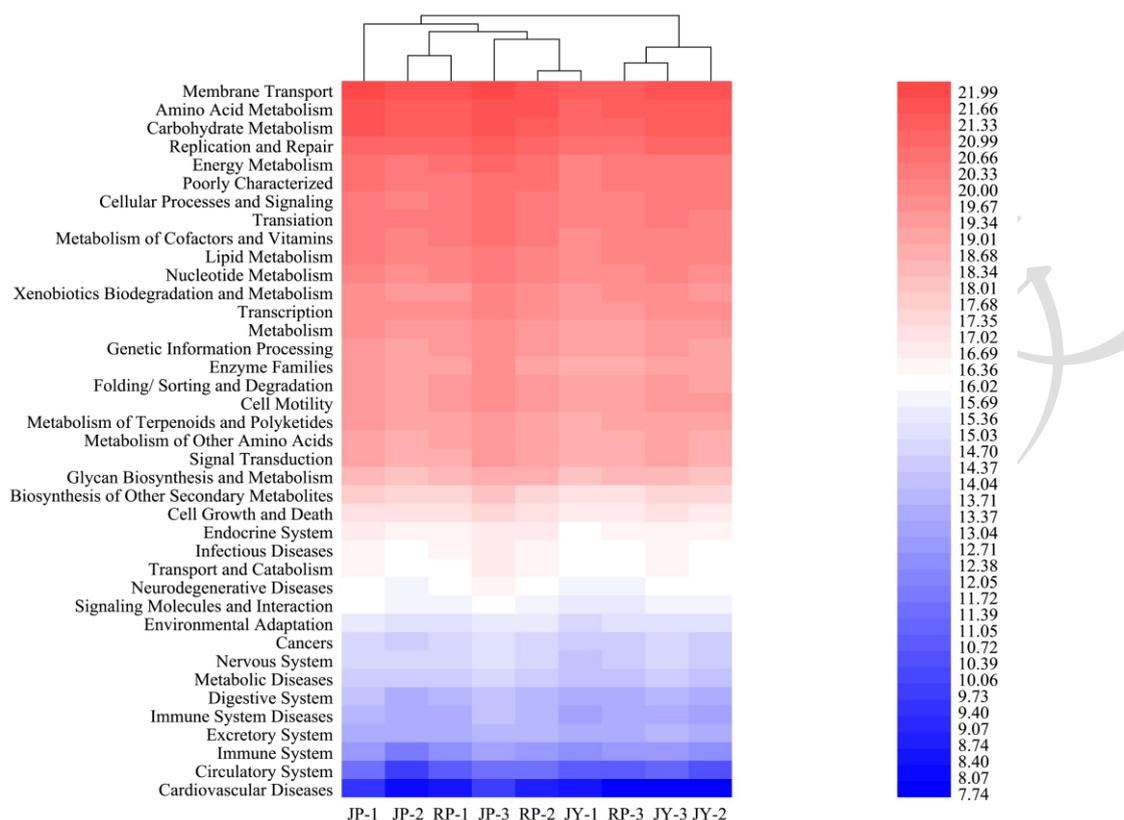


图 6 酱香大曲细菌群落功能预测

Fig.6 Prediction of bacterial community function of Jiangxiang Daqu

根据图 6 结果可以发现,酱香大曲细菌功能基因主要参与的生命活动包括膜运输 (Membrane Transport)、氨基酸代谢 (Amino Acid Metabolism)、糖代谢 (Carbohydrate Metabolism)、复制修复 (Replication and Repair) 和能量代谢 (Energy Metabolism) 等,与相关研究中细菌群落功能大体相近^[33]。在这其中,膜运输主要与糖类和酶类等物质进出细胞有关,细菌生长繁殖离不开这两类物质大量参与,因而膜运输功能基因丰度最高^[33,34];氨基酸作为白酒主要香味物质酯类合成的前体物质,影响着酯类物质的合成,故氨基酸代谢较为活跃^[35];细菌微生物利用原料或原料降解产生的糖类物质生成能量供自身生长繁殖导致糖类代谢和能量代谢丰度也较高^[36];另外大量细菌在曲块中生长繁殖则会导致复制修复基因更加活跃^[37]。另外从图 6 中关于各酱香大曲细菌群落预测功能基因的聚类分析可以看出,JP-2 与 RP-1 极为相似,JP-2 和 JP-3 与 RP-2 和 JY-1 也较为相似,JP-1 与 RP-1、RP-2 和 JY-1 也略有相似,说明机械曲和人工曲在细菌群落功能基因上较为相似,此外,普通小麦曲和有机小麦曲也存在一定的相似性。

3 结论

本研究采用传统微生物培养技术结合高通量测序技术探究了制曲原料和制曲方式对酱香大曲微生物数量和细菌群落结构的影响。研究表明:

(1)不同制曲条件下生产的酱香大曲所有细菌归属于 5 个门的 17 个属,门水平上以厚壁菌门和放线菌门等为主,属水平上 *Kroppenstedtia*、芽孢杆菌属和高温放线菌属等细菌占据主导地位,但各酱香大曲细菌群落调节机制和 Hub 微生物存在一定差异;

(2)就细菌和霉菌数量、细菌群落多样性、细菌群落丰度稳定性而言,普通曲相较于有机曲有所欠缺,但是两者群落结构较为相似,并且通过筛选普通小麦品种有潜力减少两者之间的差距;

(3)在细菌和霉菌数量、细菌群落多样性、细菌群落丰度上,人工曲略优于机械曲,且两者细菌群落结构极为接近;

(4)就细菌群落功能基因而言,机械曲和人工曲较为相似,普通小麦曲和有机小麦曲也存在一定的相似性。

参考文献

- [1] 郭学武,范恩帝,马冰涛,等.中国固态发酵白酒中功能细菌研究进展[J].食品与发酵工业,2020,46(1):280-286.
- [2] Wang M Y, Yang J G, Zhao Q S, et al. Research progress on flavor compounds and microorganisms of Maotai flavor Baijiu [J]. *Journal of Food Science*, 2019, 84(1): 6-18.
- [3] Song Z W, Du H, Zhang Y, et al. Unraveling core functional microbiota in traditional solid-state fermentation by high-throughput amplicons and metatranscriptomics sequencing [J]. *Frontiers in Microbiology*, 2017, 8: 1294.
- [4] Zheng X W, Han B Z. Baijiu, Chinese liquor: History, classification and manufacture [J]. *Journal of Ethnic Foods*, 2016, 3(1): 19-25.
- [5] Wang B W, Wu Q, Xu Y, et al. Synergistic effect of multiple saccharifying enzymes on alcoholic fermentation for Chinese Baijiu production [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2020, 86(8): 13-20.
- [6] Liu X, Guo K L, Zhang H X. Determination of microbial diversity in Daqu, a fermentation starter culture of Maotai liquor, using nested PCR-denaturing gradient gel electrophoresis [J]. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 2012, 28: 2375-2381.
- [7] Wang C L, Shi D J, Gong G L. Microorganisms in Daqu: a starter culture of Chinese Maotai-flavor liquor [J]. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2008, 24(10): 2183-2190.
- [8] 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]. *Peer J*, 2020, 8: e9122.
- [9] Zhang Y J, Wang P C, Long Z F, et al. Research progress of soil microorganism application based on high-throughput sequencing technology [J]. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 2021, 692: 42059.
- [10] Quijada N M, M H, D R. High-throughput sequencing and food microbiology [J]. *Advances in Food and Nutrition Research*, 2020, 91: 275-300.
- [11] Pallen M J, Loman N J, Penn C W. High-throughput sequencing and clinical microbiology: progress, opportunities and challenges [J]. *Current Opinion in Microbiology*, 2010, 13(5): 625-631.
- [12] Guan T W, Yang H, Ou M Y, et al. Storage period affecting dynamic succession of microbiota and quality changes of strong-flavor Baijiu Daqu [J]. *LWT*, 2020, 139: 110544.
- [13] Wang H, Huang Y G, Huang Y L. Microbiome diversity and evolution in stacking fermentation during different rounds of Jiang-flavoured Baijiu brewing [J]. *LWT*, 2021, 143: 111119.
- [14] 熊小毛,严楠峰,黄莹娜,等.兼香型白云边酒不同工艺高温大曲差异性分析[J].酿酒科技,2014,1:21-23.
- [15] Du H, Wang X S, Zhang Y H, et al. Exploring the impacts of raw materials and environments on the microbiota in Chinese Daqu starter [J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2019, 297: 32-40.
- [16] Wang Q, Zhang H X, Liu X. Microbial community composition associated with Maotai liquor fermentation [J]. *Journal of Food Science*, 2016, 81(6): M1485-M1494.
- [17] 简晓平,施永祥,王涛,等.机制大曲和人工大曲生物、理化指标比较分析[J].酿酒科技,2014,1:55-58.
- [18] Nitika, Punia D, Khetarpaul N. Physico-chemical characteristics, nutrient composition and consumer acceptability of wheat varieties grown under organic and inorganic farming conditions [J]. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 2008, 59(3): 224-245.
- [19] Edgar R C. UPARSE: Highly accurate OTU sequences from microbial amplicon reads [J]. *Nature Methods*, 2013, 10(10): 996-998.
- [20] 马冰涛,范恩帝,李泽霞,等.老白干香型白酒酿造微生物菌群及其与微量成分的关系[J].食品科学技术学报,2020,38(2):20-33.
- [21] 唐佳代,刘力萍,龙亚飞,等.不同感官特性酱香大曲真菌群落结构与理化特性[J].食品科学,2022,43(14):193-198.
- [22] Gou M, Wang H Z, Yuan H W, et al. Characterization of the microbial community in three types of fermentation starters used for Chinese liquor production[J]. *Journal of the Institute of Brewing*, 2015, 121(4): 620-627.
- [23] De'ath G. The multinomial diversity model: linking Shannon diversity to multiple predictors [J]. *Ecology*, 2012, 93(10): 2286-2296.
- [24] 王源,李微微,李秀婷,等.北京地区酱香型白酒第六轮次堆积发酵中细菌群落多样性分析[J].食品科学技术学报,2022, 40(3):68-76.
- [25] 王莹,张建海,王勇亮,等.包装方式和贮藏温度对羊肉微生物数量、细菌多样性和代谢途径的影响[J].食品科学,2022, 43(21):305-314.
- [26] 贺成虎,赵海珍,陆兆新,等.高通量测序分析麦麸发酵过程中微生物群落结构的变化[J].食品科学,2020,41(24):102-109.
- [27] Li H, Lian B, Ding Y H, et al. Bacterial diversity in the central black component of Maotai Daqu and its flavor analysis [J]. *Annals of Microbiology*, 2014, 64(4):

- 1659-1669.
- [28] 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, 11: 1-13.
- [29] Agler M T, Ruhe J, Kroll S, et al. Microbial hub taxa link host and abiotic factors to plant microbiome variation [J]. *PLoS Biology*, 2016, 14(1): e1002352.
- [30] Anderson M J, Ellingsen K E, Mcardle B H. Multivariate dispersion as a measure of beta diversity [J]. *Ecology Letters*, 2006, 9(6): 683-693.
- [31] Tanabe M, Kanehisa M. Using the KEGG database resource [J]. *Current Protocols in Bioinformatics*, 2012, 38(1): 1-12.
- [32] Langille M G I, Zaneveld J, Caporaso J G, et al. Predictive functional profiling of microbial communities using 16S rRNA marker gene sequences [J]. *Nature Biotechnology*, 2013, 31(9): 814-821.
- [33] Xie M X, An F Y, Zhao Y, et al. Metagenomic analysis of bacterial community structure and functions during the fermentation of da-jiang, a Chinese traditional fermented food [J]. *LWT*, 2020, 129: 109450.
- [34] Kaback H R. Molecular biology and energetics of membrane transport [J]. *Journal of Cellular Physiology*, 1976, 89(4): 575-593.
- [35] Xu Y Q, Zhao J R, Liu X, et al. Flavor mystery of Chinese traditional fermented baijiu: The great contribution of ester compounds [J]. *Food Chemistry*, 2021, 369: 130920.
- [36] Kaneko J J. 1-Carbohydrate Metabolism and Its Disorders [M]// *Clinical Biochemistry of Domestic Animals* (Third Edition). Academic Press, 1980: 1-51.
- [37] Song B K, Li Z H, Si L, et al. Functional metagenomic and enrichment metatranscriptomic analysis of marine microbial activities within a marine oil spill area [J]. *Environmental Pollution*, 2021, 274: 116555.