

# 不同粉碎度小麦发酵高温大曲的微生物群落结构及功能特征比较

杨阳<sup>1,2,3</sup>, 张芮<sup>1</sup>, 于惠<sup>1</sup>, 刘文虎<sup>1</sup>, 张立强<sup>1</sup>, 冉茂芳<sup>1</sup>, 沈才洪<sup>1</sup>, 王松涛<sup>1\*</sup>

(1. 泸州品创科技有限公司, 国家固态酿造工程技术研究中心, 四川泸州 646000) (2. 江南大学生物工程学院, 江苏无锡 214122) (3. 国家市场监管重点实验室(白酒监管技术), 四川成都 611731)

**摘要:** 该研究将不同粉碎度的小麦分别用于高温大曲发酵, 对发酵过程变化及成曲率进行监测, 并运用宏基因组测序技术对发酵结束后黑、黄、白曲的微生物群落结构及功能特征进行解析。结果表明, 低粉碎度组曲坯温度最快达到 60 °C, 且三次升温松弛有度, 不会长时间过热, 成品曲中黄曲占比最高 (82.37%)。高粉碎度组黑、黄曲中主要细菌累积相对丰度占比达 28.95% 以上, 远高于其余两组。中、低粉碎度组黑、黄曲中微生物群落以曲霉菌属 (*Aspergillus*)、罗萨氏菌属 (*Rasamsonia*)、拟青霉菌属 (*Paecilomyces*)、篮状菌属 (*Talaromyces*) 等真菌为主, 主要真菌总占比达 73.95% 以上, 明显高于高粉碎度组。黑曲和黄曲的大曲糖苷水解酶 (Glycoside Hydrolases, GHs) 基因主要由罗萨氏菌属、曲霉菌属、拟青霉菌属等散囊菌目真菌贡献 (占比 46.78%~62.33%), 白曲中的 GH 基因主要源于糖多孢菌属 (*Saccharopolyspora*)。研究结果进一步证实了小麦粉碎度对大曲品质的重要影响, 并初步探究了不同碳水化合物活性酶基因的微生物来源, 对全面了解高温大曲发酵、科学指导高温大曲生产有切实参考。

**关键词:** 高温大曲; 小麦粉碎度; 发酵; 宏基因组; 微生物群落; 代谢功能

文章编号: 1673-9078(2024)07-72-80

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2024.7.0912

## Comparison of Microbial Community Structures and Functional Characteristics in High-temperature Daqu Fermented from Wheat Ground to Different Degrees

YANG Yang<sup>1,2,3</sup>, ZHANG Rui<sup>1</sup>, YU Hui<sup>1</sup>, LIU Wenhui<sup>1</sup>, ZHANG Liqiang<sup>1</sup>, RAN Maofang<sup>1</sup>, SHEN Caihong<sup>1</sup>, WANG Songtao<sup>1\*</sup>

(1. Luzhou Pinchuang Science & Technology Co. Ltd., National Engineering Research Center of Solid-state Brewing, Luzhou 646000, China) (2. School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China) (3. Key Laboratory of Baijiu Supervising Technology for State Market Regulation, Chengdu 611731, China)

引文格式:

杨阳, 张芮, 于惠, 等. 不同粉碎度小麦发酵高温大曲的微生物群落结构及功能特征比较[J]. 现代食品科技, 2024, 40(7): 72-80.

YANG Yang, ZHANG Rui, YU Hui, et al. Comparison of microbial community structures and functional characteristics in high-temperature Daqu fermented from wheat ground to different degrees [J]. Modern Food Science and Technology, 2024, 40(7): 72-80.

收稿日期: 2023-07-28

基金项目: 四川省中央引导地方科技发展专项项目 (2021ZYD0102)

作者简介: 杨阳 (1992-), 女, 博士研究生, 工程师, 研究方向: 酿酒微生物研究, E-mail: doublewhy@163.com

通讯作者: 王松涛 (1977-), 男, 博士, 高级工程师, 研究方向: 酿酒微生物与酿酒工艺研究、食品原料开发, E-mail: wangst@lzl.com

**Abstract:** Wheat ground to different degrees was fermented in high-temperature Daqu (HT-Daqu) to evaluate the effects of grinding on fermentation and the maturity ratio. After fermentation, the microbial community structures and functional characteristics of three categories (black, yellow, and white) of HT-Daqu were analyzed via metagenomic sequencing. The temperature of the low-grinding-degree group reached 60 °C in the shortest time, with time gaps observed in three temperature rises with no prolonged overheating. Yellow Daqu accounted for 82.37% of the mature Daqu in this group, which was the highest ratio among the three groups with different grinding degrees. The total relative abundance of major bacteria in black and yellow Daqu of the high-grinding-degree group was more than 28.95%, which was higher than that in the other two groups. *Aspergillus*, *Rasamsonia*, *Paecilomyces*, and *Talaromyces* dominated the microbial community in the medium- and low-grinding-degree groups, accounting for more than 73.95% of the total, significantly higher than the high-grinding-degree group. The genes of glycoside hydrolases in black and yellow Daqu were mainly contributed by Eurotiales including *Rasamsonia*, *Aspergillus*, and *Paecilomyces* (46.78%~62.33%), while those in white Daqu were found to be mainly derived from *Saccharopolyspora*. These results demonstrate the importance of the grinding degree of wheat on the quality of Daqu and identifies the microbial sources of genes encoding different carbohydrate-active enzymes. The findings have a practical significance for understanding the fermentation of HT-Daqu comprehensively and guiding the production of HT-Daqu scientifically.

**Key words:** high-temperature Daqu; grinding degree of wheat; fermentation; metagenomics; microbial community; metabolic function

高温大曲以小麦为主要原料,经润麦磨碎、拌曲配料、曲坯成型、安曲入仓、自然发酵、出仓贮存等环节而成<sup>[1,2]</sup>。成熟高温大曲在酱香型白酒生产过程中担任着微生物制剂、复合酶制剂和风味物质载体等重要角色,与酱酒品质及风格形成密不可分<sup>[3]</sup>。根据成品曲色泽,高温大曲可分为黑、黄、白曲三种类型:黑曲虽有曲香但带焦糊味;黄曲有浓郁曲香味和酱香味,为酱香型白酒酿造所需优质曲;白曲有生麦味,曲香差<sup>[4]</sup>。

由于小麦粉碎度关联着曲坯成型的内部结构,进而可影响曲坯后期培菌阶段的保水性能、升温状况及微生物繁殖代谢,已成为机械制曲中的关键控制点之一<sup>[5]</sup>。谭崇尧等<sup>[6]</sup>发现小麦粉碎度对大曲质量有很大的影响,粉碎过细时,曲坯粘着紧、生酸多,大曲穿衣缓慢,粉碎过粗时,曲坯中挺不足,成品曲粗糙无衣、曲皮较厚。张明基<sup>[5]</sup>于对润麦水分、润麦时间、磨辊温度等因素与小麦粉碎度间的关联分析结果,制定相关调控措施,在使麦粉中皮张、粗粉、细粉达到适宜比例的同时兼顾粉碎度的稳定性,从而提升了大曲品质。徐帅哲<sup>[7]</sup>将不同破碎度的小麦原料用于制作酱香大曲,发现小麦破碎度对酱香型大曲堆积发酵过程及微生物生长代谢具有调控作用,对酱香型大曲品质影响显著,当小麦破碎度(细粉质量/粗皮质量×100%)约38%时,成曲率最高,品质最佳。

目前,关于小麦粉碎度对大曲发酵影响的研究主要依靠生产经验总结及传统理化试验,在对影响的呈现和对机制的探索上尚缺乏科学设计下的深入研究。宏基因组测序作为一项快速发展的现代分子技术,突破了扩增子测序技术无法精确到种水平、对功能基因的挖掘存在明显局限性等技术瓶颈<sup>[8]</sup>。研究者们已将其应用于奶酪<sup>[9]</sup>、黄酒<sup>[10]</sup>、康普茶<sup>[11]</sup>、大曲<sup>[12]</sup>等发酵产品的研究中,以揭示其中微生物的菌落交替、相互作用关系及生理生化功能。

基于此,本研究将同批小麦原料处理成不同的粉碎度后分别用于高温大曲堆积发酵,监测发酵过程中的理化指标变化情况,并最终采集不同粉碎度小麦分别制成的黑、黄、白三种类型成品曲,结合宏基因组学对大曲的微生物多样性及代谢潜能进行了解析,以期优化机械制曲工艺、控制高温大曲品质提供科学参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

高温大曲样品由同批产自河南的软质小麦(*Triticum aestivum*)经发酵制成,于2022年8月至10月采集自四川省泸州市某酒厂制曲车间。

### 1.2 主要仪器与设备

长探头不锈钢数显温度计,衡水耀威仪表商贸

有限公司; TL2010S 中通量组织研磨破碎仪, 鼎浩源科技发展(天津)有限公司; Sub System 70 电泳槽, 美国 Labnet 公司; Mini-300 电泳仪, 美国 Major Science 公司; NanoDrop 2000 微量紫外可见分光光度计, 美国 Thermo Scientific 公司; 5804R 冷冻离心机, 德国 Eppendorf 公司; SevenExcellence 多参数测试仪, 瑞士 Mettler-Toledo 公司。

### 1.3 实验方法

#### 1.3.1 样品采集

将同批次软质小麦分别用磨粉机处理成高粉碎度(High)、中粉碎度(Mid)、低粉碎度(Low)三种类型(原料粉碎后不通过 20 目筛的粗粉所占质量百分数分别约为 55%、60%、65%), 按照相同的生产工艺加入一定量的母曲和水分, 拌和后压制成型, 以“横三竖三”的方式堆积在相邻的三间发酵房内进行自然发酵, 每间曲房均安曲 2 500 块左右。以“粉碎程度-粗粉比例”对分组进行命名(High-55%、Mid-60%、Low-65%)。同一曲房内, 所有曲坯表面和内部以谷草包覆和相隔, 被安置于一个较大型的、相对紧实的曲堆之中, 连续取样存在一定难度, 一是需尽可能地保证样品采集于曲堆同一深度, 二是需尽量少地破坏曲堆内部的发酵环境。

有鉴于此, 本实验的样品采集分为发酵过程中(侧重过程监测)及发酵完成后(侧重菌群研究)两个部分。发酵过程中的样品采集由同一名技术人员完成, 分别于第 0(入房)、2、4、6、8(第一轮翻曲)、10、12、14、16(第二轮翻曲)、24、32、40 天(出房)从曲堆靠中深度处仅抽取一块符合正常发酵感官规律的曲坯, 粉碎后取适量于无菌袋中, 贮存于  $-20^{\circ}\text{C}$ , 待检测理化指标; 当大曲发酵至 40 d 时, 另进行发酵结束后的成品曲采集, 分别于各曲房靠内、靠中、靠外的相似位置分别取符合正常发酵感官规律的黑、黄、白曲各三个平行样, 共计 27 块。同组平行样品在粉碎后互相混合均匀, 取适量于无菌自封袋中, 贮存于  $-80^{\circ}\text{C}$ , 待提取总 DNA 进行宏基因组测序。

#### 1.3.2 理化指标检测

##### 1.3.2.1 温度

在每间靠门、靠中、靠窗的位置, 向各曲堆中心各安插一支长探头不锈钢温度计, 每日定时记录。

##### 1.3.2.2 水分、酸度、粗淀粉、糖化力

参照轻工业行业标准 QB/T 4257-2011《酿酒

大曲通用分析方法》, 对样品水分、总酸、粗淀粉、糖化力数值进行测定。

#### 1.3.3 成品曲中不同颜色类型占比计算

发酵第 40 天时进行拆曲操作, 通过肉眼观察确定成品曲坯的颜色类型。若表面和断面呈焦黑色, 视为发酵过度的黑曲; 若表面呈金黄色或黄褐色, 断面呈灰色或金黄色, 视为发酵正常的黄曲; 若表面和断面呈白色或麦色, 视为发酵不足的白曲。其中, 黄曲为酱香型白酒生产所需的优质大曲, 表面应呈现均匀金黄色或黄褐色, 曲坯应完整、无断裂、发酵完全, 曲心无窝水, 表面无杂菌斑。不同颜色类型的成品曲占比以“对应颜色类型成品曲数量/成品曲总数量 $\times 100\%$ ”定义。

#### 1.3.4 基因组DNA提取和宏基因组测序

以组织研磨破碎仪结合液氮冷冻对适量样品进行预处理, 后使用土壤 DNA 试剂盒(Omega, 美国)提取大曲样品总 DNA。对收集到的 DNA 以 1% 的琼脂糖凝胶进行电泳检测, 并通过微量分光光度计测得质量和浓度。将符合上机要求的 DNA 样品干冰运送至上海美吉生物医药科技有限公司, 使用 HiSeq<sup>TM</sup> X Ten 平台(Illumina, 美国)进行宏基因组测序。

#### 1.3.5 数据处理

参考之前的研究方法对序列进行质控过滤、去宿主序列、组装预测、构建样品非冗余基因集、KEGG 数据库和 CAZy 数据库注释、丰度计算等操作<sup>[13]</sup>, 最终得到相应的数据矩阵。采用 R 4.2.3 进行 PCoA、PCA 分析及柱形图的绘制, 采用 GraphPad Prism 8 进行折线图绘制, 采用 Adobe Illustrator CS6 对图片进行优化排版。

## 2 结果与讨论

### 2.1 不同小麦粉碎度高温大曲发酵过程中理化指标分析

对不同小麦粉碎度高温大曲发酵过程中的主要理化指标进行监测(图 1), 一方面可以了解大曲微生物的生长环境, 另一方面能够进一步掌握菌群生理代谢对大曲的潜在影响。

如图 1a 所示, 三组大曲在发酵过程中顶温均可达  $60^{\circ}\text{C}$  以上, 符合高温大曲生产要求<sup>[14]</sup>。第 0 至 8 天(第一轮翻曲前)、第 8 至 16 天(第一轮翻曲后)、第 16 天后(第二轮翻曲后), 三组高温大

曲均经历了三次升温。其中，低粉碎度组及中粉碎度组升温情况较为相似，升温速度、顶温温度均优于高粉碎度组大曲，这可能与原料中粗粉比例较高、曲坯空隙度大、透气性好有关。在较高的氧气含量条件下，某些好氧微生物生长迅速，产生大量生物热。在第二轮翻曲之后的发酵后期，氧气、水分、营养物质等环境因素的变化在很大程度上限制了微生物的生长代谢，微生物所产生的生物热不足，曲心发酵温度逐步下降。而高粉碎度组大曲在第25天至35天期间保持了较长时间的顶温，这可能与其中的微生物在前期生长相对缓慢，营养物质消耗慢于其它两组，胁迫因素积累较少等因素有关，最终造成此组曲坯累积生物热的进程慢于其它两组，且高粉碎度组曲坯孔隙度更小，可能也不利于后期散热。

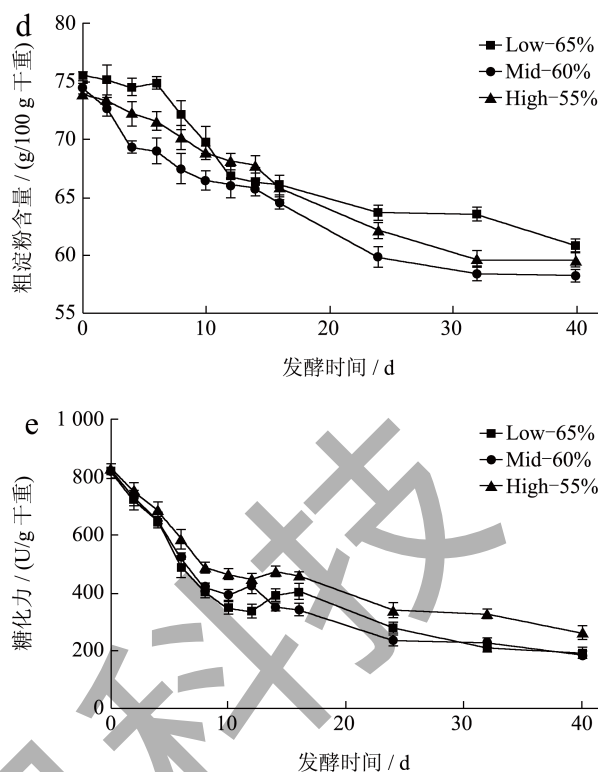
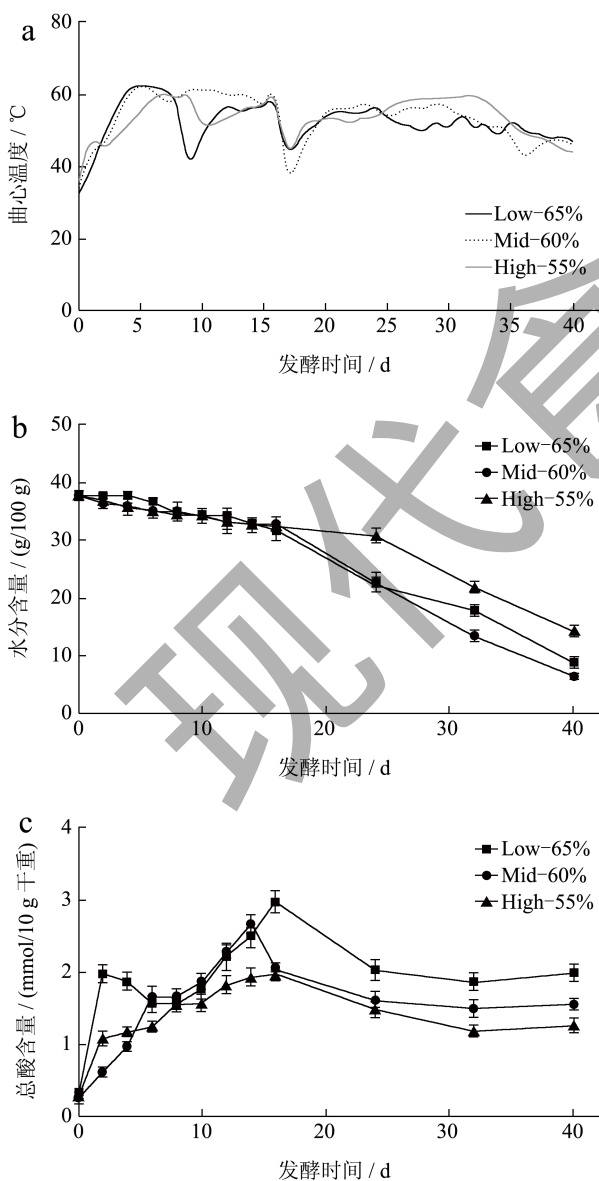


图1 不同小麦粉碎度高温大曲发酵过程中的理化指标变化  
Fig.1 Dynamics of physicochemical properties during the fermentation process of HT-Daqu made from wheat of different grinding degrees

注：(a) 温度；(b) 水分；(c) 总酸；(d) 粗淀粉；(e) 糖化力。

如图1b所示，高粉碎度组水分整体下降趋势相较其它两组更加缓慢，同样提示此组大曲发酵前中期（第0至24天）微生物的生长代谢活动较为缓慢，且更高占比的细粉可能使得曲坯本身更为紧实、锁水能力更强。李娟等<sup>[15]</sup>研究发现，高粉碎度组（粉碎度为60%）的曲坯水分排出过慢，细粉占比更低的曲坯水分排出较快，与本研究结果相符。

图1c中的总酸变化情况则反映出，高粉碎度组大曲微生物产酸情况略弱于其它两组，有鉴于大曲有机酸是酯类等代谢产物的重要前体，高粉碎度组大曲在提供有机酸上的受限可能也会随之影响其累积酯类等物质的能力。

粗淀粉（图1d）和糖化力（图1e）都能够一定程度上反映大曲糖化酶对原料淀粉的利用情况和潜力。结合两图可发现，大曲中淀粉的糖化过程是贯穿堆积发酵始终的，发挥作用的糖化酶既有小麦细胞来源，也有微生物细胞来源<sup>[16]</sup>。发酵结束后，三组大曲的粗淀粉含量在58.26~60.88 g/100 g干重

范围内, 糖化力在 186~262 U/100 g 干重范围内, 未因为原料粉碎度的梯度差异拉开明显、规律的差距。另外可以看出, 大曲糖化力高并未与曲坯中淀粉的分解程度画上等号, 这说明淀粉的分解过程还有某些其它的环境因素在其中参与调控。

### 2.2 不同小麦粉碎度高温大曲成品曲中类型分布

在常规的高温大曲生产中, 当发酵结束进行拆曲时, 会发现同一曲堆能生产出黑、黄、白三种类型大曲。黄曲在成品曲中的占比能够较为有效地反映高温大曲的发酵效果<sup>[17]</sup>。

如表 1 所示, 低粉碎度组成品曲中的黄曲占比高于其它两组, 为 82.37%, 白曲占比最少, 为 8.71%; 高粉碎度组成品曲中的黄曲占比最少, 为 79.21%, 白曲占比最多, 为 11.42%。结合理化指标变化情况, 我们发现低粉碎度组大曲温度能最快达到 60 °C, 且在发酵中的三次升温松弛有度, 曲坯不会长时间处于过热状态。Luo 等<sup>[18]</sup>研究发现, 黑曲的形成主要与酶促褐变产物黑色素和美拉德反应产物类黑素的大量累积有关, 其中后者的生成便容易受到高温因素的促进。因此, 低粉碎度组曲坯的温度变化特点能够帮助控制成品中的白曲占比, 同时也有效阻碍了焦变黑曲的产生。

表 1 不同小麦粉碎度高温大曲成品曲中的类型分布

Table 1 Type distribution of mature HT-Daqu made from wheat of different grinding degrees (%)

组别	白曲	黄曲	黑曲
Low-65%	8.71	82.37	8.92
Mid-60%	9.64	81.04	9.32
High-55%	11.42	79.21	9.37

### 2.3 不同小麦粉碎度高温大曲发酵过程中微生物物种组成分析

三组粉碎度小麦发酵获得的黑、黄、白曲 DNA 经宏基因组测序, 共获得 828 355 694 条 Reads, 其中 98.1% 的序列为高质量序列, 经过 Megahit 组装共获得 1 130 326 条 Contigs, 经过 MetaGene 共预测得 1 449 632 个开放阅读框 (Open Reading Frames, ORFs), 经 CD-HIT 聚类得到由 1 091 768 个基因组成的非冗余基因集, 基因平均长度为 365.7 bp。共有 553 118 条非冗余基因在 NR 数据库中显示出明确的物种注释信息, 分布于 383 个目、1 856 个属中,

不同小麦粉碎度组高温大曲成品曲的微生物群落组成如图 2 所示。

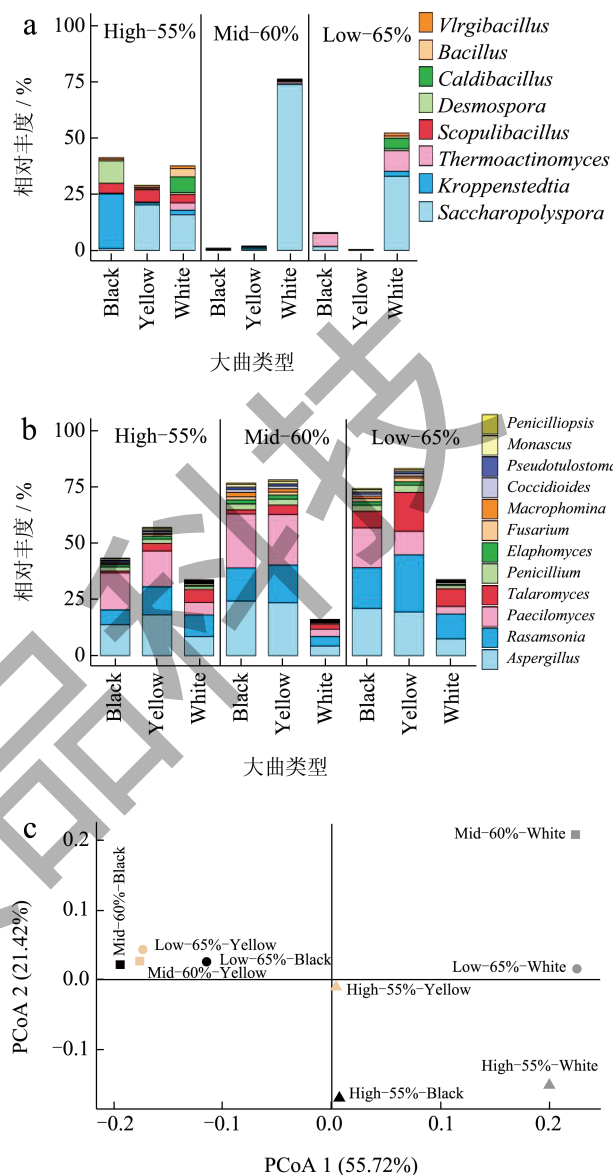


图 2 不同小麦粉碎度高温大曲成品曲中的微生物群落结构

Fig.2 Microbial community structure of mature HT-Daqu made from wheat of different grinding degrees

注: (a) 相对丰度总排名前 20 的微生物属 (细菌部分) 堆积柱状图; (b) 相对丰度总排名前 20 的微生物属 (真菌部分) 堆积柱状图 (c) 基于属水平的微生物群落组成主坐标分析。

由图 2a 和图 2b 对比可知, 在三个粉碎度组白曲的微生物群落中, 主要细菌菌属的相对丰度累积值均高于主要真菌属, 这与张芮等<sup>[19]</sup>关于常规高温大曲微生物组成的研究结果相印证。白曲以糖多孢菌属 (*Saccharopolyspora*) 为优势菌 (三组中相对

丰度分别为 15.77%、73.83%、32.87%)，另伴有一定量克罗彭施泰特氏菌属 (*Kroppenstedtia*)、高温放线菌属 (*Thermoactinomyces*) 以及热芽孢杆菌属 (*Caldibacillus*) 细菌。糖多孢菌是一类需氧放线菌，也是某些中、低温麦曲中的主要细菌<sup>[20,21]</sup>，Ma 等<sup>[22]</sup>将一株玫瑰糖多孢菌 (*Saccharopolyspora rosea*) 应用于黄酒酿造，最佳发酵温度为 45 °C。这部分解释了为何在本研究之中，糖多孢菌主要出现在位于曲堆边缘、曲心温度较低的白曲之中。

高粉碎度组黑、黄曲的细菌群落组成与另外两组黑、黄曲差异明显，且细菌属累积相对丰度占比远高于后者，这说明小麦原料的高粉碎度有助于细菌菌群在生态位的争夺中取得更多优势。高粉碎度组的黑曲以克罗彭施泰特氏菌属、芽孢链菌属 (*Desmospora*)、岩石芽孢杆菌属 (*Scopulibacillus*) 为优势菌，黄曲主要以糖多孢菌属、岩石芽孢杆菌属为优势菌，与同组白曲的优势细菌组成较为相似。与其它两组明显不同的是，高粉碎度组的三种颜色大曲中均分布了一定量的岩石芽孢杆菌，提示小麦原料的高粉碎度可能更有利于这类芽孢菌的生长。值得注意的是，虽然克罗彭施泰特氏菌属、芽孢链菌属、高温放线菌属未以“*Bacillus*”一词结尾，但它们同属于芽孢杆菌目 (*Bacillales*) 并能形成芽孢，具有很强的抗逆性，因此和带“*Bacillus*”词尾的岩石芽孢杆菌属、热芽孢杆菌属共同组成了高温大曲中的主要细菌群落<sup>[23]</sup>。

中、低粉碎度组黑、黄曲中微生物群落以真菌为主，真菌属累积相对丰度均达 70% 以上，曲霉菌属 (*Aspergillus*)、罗萨氏菌属 (*Rasamsonia*)、拟青霉菌属 (*Paecilomyces*)、篮状菌属 (*Talaromyces*) 为其中的优势真菌，均属于散囊菌目 (*Eurotiales*)。高粉碎度组黑、黄曲微生物群落中的真菌累积相对丰度相较前两组更少，约在 40%~60% 范围内，这可能与高粉碎度小麦所制曲坯的低疏松度、低透氧性有关，低氧条件不利于丝状真菌的霉菌生长<sup>[24]</sup>。值得注意的是，无论原料粉碎度和颜色类型如何，样品在优势真菌属的种类上均高度相似，这表明不同小麦粉碎度在发酵过程中衍生出的菌群丰度差异对大曲造成的影响是很大的。李娟<sup>[15]</sup>通过传统平板计数发现，不同小麦粉碎度曲坯在培曲过程中的酵母、霉菌、芽孢杆菌数量差异明显，粉碎度过低会

导致培曲后期不同菌群近乎衰亡，成品曲感官品质差劲。

主坐标分析 (图 2c) 结果显示：中、低粉碎度小麦经发酵制成的黑曲和黄曲微生物群落结构相近，四者被聚成一簇，而高粉碎度小麦发酵制成的黑、黄曲与前两组黑、黄曲微生物群落结构差异明显；三组白曲在 PCoA 1 轴上距离非常接近，但它们与同组的黑、黄曲间在 PCoA 1 轴上距离较大，反映出明显的菌群结构差异。由此可见，不同粉碎度的小麦对白曲的微生物群落结构影响相对更小，而小麦粉碎度若过高，主要会对黑、黄曲菌群的塑造产生较大影响，使之偏离较低粉碎程度小麦发酵时的菌群演替方向。

## 2.4 不同小麦粉碎度高温大曲发酵过程中微生物功能特征分析

### 2.4.1 基于KEGG数据库的功能特征分析

共有 78 579 条非冗余基因在 KEGG 数据库中显示出明确的功能注释信息，共计 12 783 个 KO (KEGG Orthology)，将这些 KO 映射到的 KEGG Pathway Level 1 (L1)、Level 2 (L2) 信息与基因丰度进行关联，可计算得到不同功能途径的相对丰度信息 (图 3)。

随着小麦粉碎度的提高，黑、黄曲中与代谢 (Metabolism) 这一 L1 途径相关的基因丰度降低 (图 3a)，而与遗传信息处理 (Genetic Information Processing)、环境信息处理 (Environmental Information Processing)、细胞过程 (Cellular Processes) 等 L1 途径相关的基因丰度则与前者相反，呈现出增长态势 (图 3b)。其中，细胞生长与死亡 (Cell Growth and Death)、运输和分解代谢 (Transport and Catabolism)、信号转导 (Signal Transduction) 等 L2 途径随小麦粉碎度的降低明显提升。相比之下，高粉碎组成品黑、黄曲菌群代谢活动更加旺盛，中、低粉碎度组成品黑、黄曲菌群更加侧重于信息处理方面，这可能与由 2.1 结果反映出的高粉碎组生长代谢活动滞后有关。此外，高粉碎度组黑、黄曲中与碳水化合物代谢 (Carbohydrate Metabolism) 相关的基因丰度相较其余两组黑、黄曲更高，这一结果也可部分解释 2.1 中呈现出的糖化力差异 (高粉碎度组大曲糖化力大于中、低粉碎组大曲糖化力)。

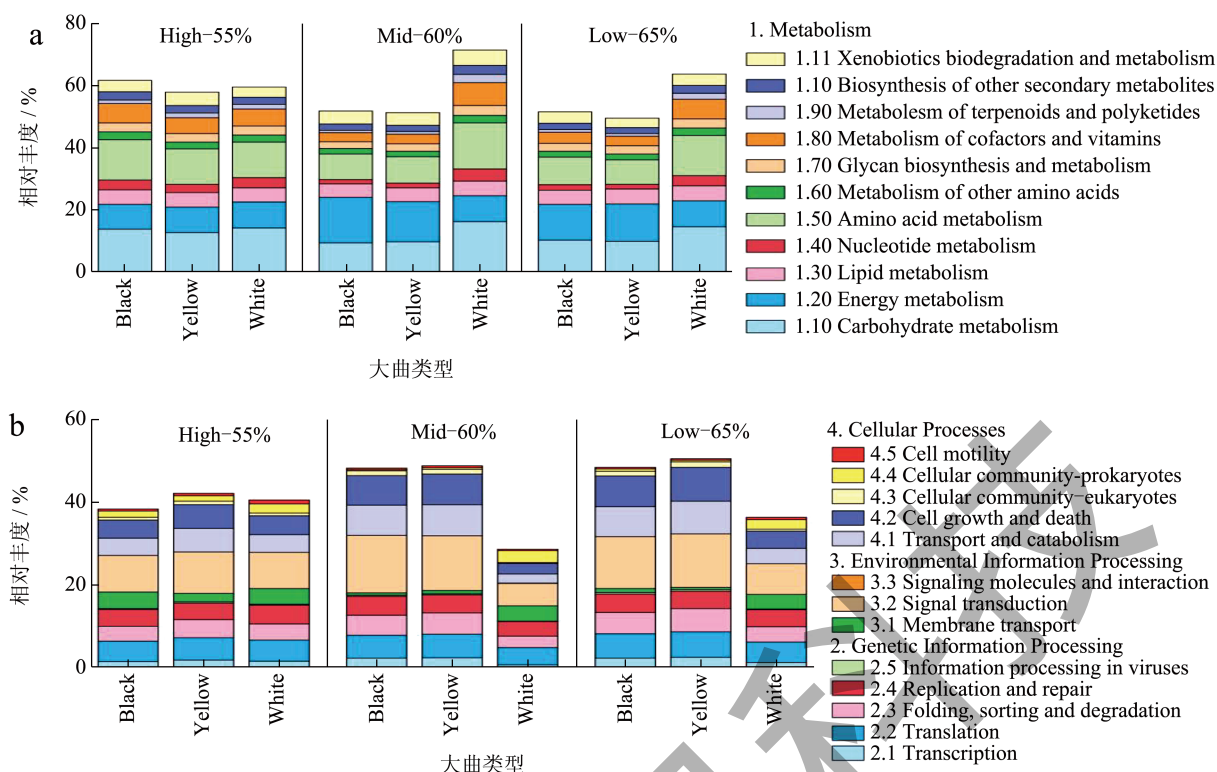


图 3 不同小麦粉碎度高温大曲成品曲中的微生物 KEGG 代谢功能组成

Fig.3 Microbial KEGG metabolic function of mature HT-Daqui made from wheat of different grinding degrees

注: (a) KEGG 代谢功能版块通路基因的堆积柱状图; (b) KEGG 其它主要功能版块通路基因的堆积柱状图。

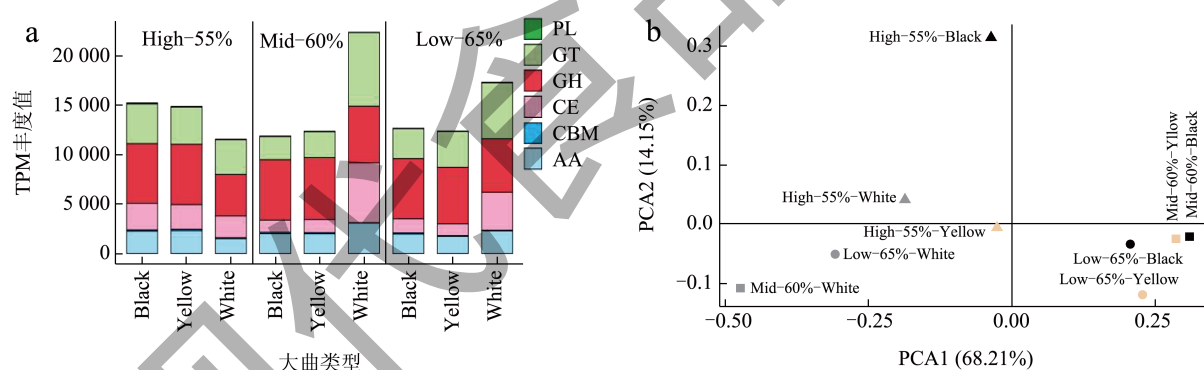


图 4 不同小麦粉碎度高温大曲成品曲中的微生物碳水化合物活性酶基因组成

Fig.4 Distribution of CAZy genes of mature HT-Daqui made from wheat of different grinding degrees

注: (a) 6 大类碳水化合物活性酶组成堆积柱状图; (b) 基于碳水化合物活性酶家族水平的微生物群落功能主成分分析。

### 2.4.2 基于CAZy数据库的功能特征分析

共有 23 927 条非冗余基因在碳水化合物活性酶数据库 (Carbohydrate-active Enzymes Database, CAZy) 中显示出明确的功能注释信息, 分属于 272 个糖苷水解酶 (Glycoside Hydrolases, GHs), 107 个糖基转移酶 (Glycosyl Transferases, GTs), 86 个多糖裂合酶 (Polysaccharide Lyases, PLs), 68 个碳水化合物结合模块 (Carbohydrate-binding Modules, CBMs), 25 个辅助氧化还原酶 (Auxiliary Activities, AAs), 16 个碳水化合物酯酶 (Carbohydrate Esterases, CEs)。

结合基因丰度值可计算出不同活性酶所对应的相对丰度, 结果如图 4a 所示。高粉碎度小麦可能在一定程度上提高了黑、黄曲的碳水化合物活性酶潜在活性, 这与 2.4.1 中 KEGG 数据库注释中碳水化合物代谢途径基因丰度的相关结果相呼应。此外, 在三个粉碎度组中, 黑、黄曲中碳水化合物活性酶基因累积丰度数值彼此接近, 但白曲中碳水化合物活性酶基因累积丰度波动较大 (三组中累积丰度分别为 11 559.41、22 345.35、17 301.94), 这可能是白曲通常位于曲堆边缘, 生境受到外部环境影响较大所造成的。

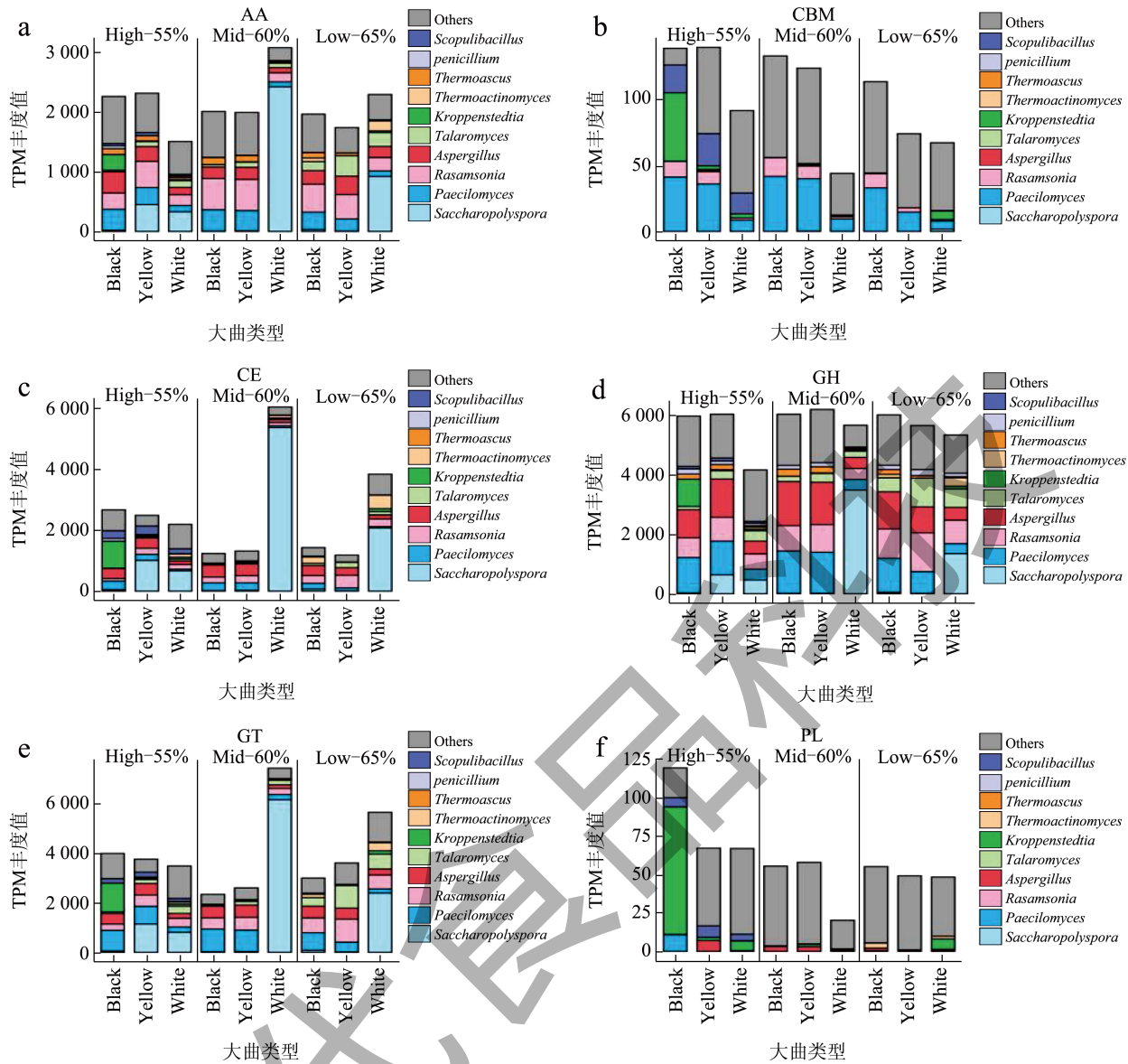


图 5 不同小麦粉碎度高温大曲成品曲中 6 大类碳水化合物活性酶基因来源菌属分布

Fig.5 Distribution of microbial genus of genes annotated to six categories of carbohydrate-active enzymes in mature

HT-Daqu made from wheat of different grinding degrees

图 4b 显示了基于高温大曲碳水化合物活性酶小类组成的主成分分析结果, PC1、PC2 对总体方差的解释百分比之和达 82.36%, 即对差异的描述性较高。各样品在坐标轴中的分布情况与基于高温大曲属水平微生物群落的主坐标分析结果类似, 主要表现为高粉碎度组的黑、黄曲与其它两组的同类大曲差异明显, 而三组白曲之间较为相似。

微生物群落组成与群落功能息息相关, 因此对各类碳水化合物活性酶的潜在微生物来源作进一步分析(图 5)。结果显示, GH 是多数大曲样品中基因丰度最高(累积绝对丰度为 4 208.68~6 263.68)的碳水化合物活性酶类, 其中, 三组黑、黄曲 GH 累积绝对丰度值均位于 5 717.41~6 263.68 区间内, 六

份样本之间丰度值差异不超过 10%, 说明小麦粉碎度对黑、黄曲 GH 基因丰度的影响较小。根据 GH 基因的物种贡献度信息, 黑曲和黄曲的 GH 主要源于罗萨氏菌属、曲霉菌属、拟青霉菌属等散囊菌目真菌(累积相对丰度为 46.78%~62.33%)。而白曲中的 GH 基因则主要源于糖多孢菌属(三组中相对丰度分别为 11.04%、61.52%、25.24%), 同时也有部分源自罗萨氏菌属、曲霉菌属、拟青霉菌属等(三组中累积相对丰度分别为 31.42%、19.44%、29.14%), 即与黑、黄曲中的 GH 主要贡献菌有一定重叠。

在后续白酒发酵中, 同样需要来自大曲的多种糖苷水解酶参与原料的分解。王柏文<sup>[25]</sup>通过溯源分析发现白酒饼曲为后续白酒发酵过程提供了 16 种糖



苷水解酶, 涵盖 9 个 GH 家族, 它们与淀粉、纤维素或半纤维素水解有关。本研究进一步明确了这一大类重要功能酶的微生物来源, 若通过定向筛选、选育优化等技术并应用于强化制曲或酿酒过程中, 对高效高质生产具有现实意义, 这也是长期聚焦的研究方向。

### 3 结论

本研究用不同粉碎度的小麦作为高温大曲发酵的原料, 以三组大曲发酵过程和发酵成品的共性与差异为切入点, 针对小麦粉碎度对大曲发酵带来的多方面影响和潜在关联进行了初步分析。研究结果表明, 低粉碎度组大曲温度能最快达到 60 °C, 且在发酵中的三次升温松弛有度, 曲坯不会长时间处于过热状态, 成品曲中黄曲占比最高。从物种上看, 中、低粉碎度组黑、黄曲中微生物群落以曲霉菌属、罗萨氏菌属、拟青霉菌属、篮状菌属等真菌为主, 而高粉碎度的小麦制曲时, 曲坯粗粉比例较低、空隙度较小、透气性较差, 这样的环境对好氧的丝状真菌霉菌生长不利, 有助于细菌菌群抢夺群落生态位。从功能上看, 较高的小麦粉碎度可能有利于大曲发展出更高的碳水化合物分解、转化活性, 不过小麦粉碎度对于大曲碳水化合物活性酶中的主要类别——GH 丰度无明显影响, 对 CE、CBM、PL 的波及程度相对更高。黑曲和黄曲的 GH 主要源于罗萨氏菌属、曲霉菌属、拟青霉菌属等散囊菌目真菌, 白曲中的 GH 基因则主要源于糖多孢菌属。总的来说, 小麦粉碎度对成品白曲的微生物群落组成和功能特征影响相对较小, 对成品黑、黄曲的影响更为明显。

### 参考文献

- [1] ZHANG Y, XU J, DING F, et al. Multidimensional profiling indicates the shifts and functionality of wheat-origin microbiota during high-temperature Daqu incubation [J]. *Food Research International*, 2022, 156: 111191.
- [2] 沈怡方. 白酒生产技术全书[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 1998.
- [3] SHI W, CHAI L J, FANG G Y, et al. Spatial heterogeneity of the microbiome and metabolome profiles of high-temperature Daqu in the same workshop [J]. *Food Research International*, 2022, 156: 111298.
- [4] 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.
- [5] 张明. 机械制曲过程中影响小麦粉碎度的因素探究及调控[J]. *酿酒科技*, 2019, 1: 76-80, 85.
- [6] 谭崇尧, 徐军, 王令. 影响大曲“穿衣”的因素及其解决措施[J]. *酿酒科技*, 2009, 6: 70-71, 75.
- [7] 徐帅哲. 小麦破碎度对酱香大曲品质和微生物多样性影响的研究[D]. 长沙: 中南林业科技大学, 2022.
- [8] CHAUDHARI H G, PRAJAPATI S, WARDAH Z H, et al. Decoding the microbial universe with metagenomics: a brief insight [J]. *Frontiers in Genetics*, 2023, 14: 1119740.
- [9] WOLFE B E, BUTTON J E, SANTARELLI M, et al. Cheese rind communities provide tractable systems for in situ and *in vitro* studies of microbial diversity [J]. *Cell*, 2014, 158(2): 422-433.
- [10] 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.
- [11] LANDIS E A, FOGARTY E, EDWARDS J C, et al. Microbial diversity and interaction specificity in kombucha tea fermentations [J]. *mSystems*, 2022, 7(3): e0015722.
- [12] GAN S H, YANG F, SAHU S K, et al. Deciphering the composition and functional profile of the microbial communities in Chinese Moutai liquor starters [J]. *Frontiers in Microbiology*, 2019, 10: 1540.
- [13] YANG Y, WANG S T, LU Z M, et al. Metagenomics unveils microbial roles involved in metabolic network of flavor development in medium-temperature daqu starter [J]. *Food Research International*, 2021, 140: 110037.
- [14] ZHENG X W, TABRIZI M R, NOUT M J R, et al. Daqu—a traditional Chinese liquor fermentation starter [J]. *Journal of the Institute of Brewing*, 2012, 117(1): 82-90.
- [15] 李娟. 机压丢糟“包包曲”生产工艺的研究[D]. 长沙: 中南林业科技大学, 2011.
- [16] ZHU Q, CHEN L, PENG Z, et al. The differences in carbohydrate utilization ability between six rounds of Sauce-flavor Daqu [J]. *Food Research International*, 2023, 163: 112184.
- [17] 王西, 陈波, 张亚东, 等. 高温大曲安曲投入老草的应用研究[J]. *酿酒科技*, 2020(12): 88-91.
- [18] LUO S, ZHANG Q, YANG F, et al. Analysis of the formation of sauce-flavored Daqu using non-targeted metabolomics [J]. *Frontiers in Microbiology*, 2022, 13: 857966.
- [19] 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.
- [20] CAI W, WANG Y, NI H, et al. Diversity of microbiota, microbial functions, and flavor in different types of low-temperature Daqu [J]. *Food Research International*, 2021, 150: 110734.
- [21] ZHANG J, LIU S, SUN H, et al. Metagenomics-based insights into the microbial community profiling and flavor development potentiality of baijiu Daqu and huangjiu wheat Qu [J]. *Food Research International*, 2022, 152: 110707.
- [22] MA D, LIU S, LIU H, et al. Developing an innovative raw wheat *Qu* inoculated with *Saccharopolyspora* and its application in Huangjiu [J]. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2022, 102(15): 7301-7312.
- [23] 王阶平, 刘波, 刘国红, 等. 芽胞杆菌系统分类研究最新进展[J]. *福建农业学报*, 2017, 32(7): 784-800.
- [24] 张志惠, 黄晓霞, 周华华. 低氧气调技术在纸质档案霉菌抑制中的应用探析[J]. *档案学通讯*, 2019, 2: 43-48.
- [25] 王柏文. 小曲糖化酶谱形成机制及其对白酒发酵过程的影响[D]. 无锡: 江南大学, 2020.