



刘延波,王一菲,赵志军,等. 包包曲与平板曲理化指标及细菌群落结构研究[J]. 轻工学报,2021,36(6):9-20.

LIU Y B, WANG Y F, ZHAO Z J, et al. Study on the physicochemical indexes and bacterial community structure of bag Daqu and brick Daqu[J]. Journal of Light Industry, 2021, 36(6):9-20. DOI:10.12187/2021.06.002

中图分类号:TS261.1 文献标识码:A 文章编号:2096-1553(2021)06-0009-12

包包曲与平板曲理化指标及细菌群落结构研究

Study on the physicochemical indexes and bacterial community structure of bag Daqu and brick Daqu

刘延波^{1,2}, 王一菲¹, 赵志军¹, 韩素娜², 王贤³, 孙西玉^{1,4},
潘春梅¹

LIU Yanbo^{1,2}, WANG Yifei¹, ZHAO Zhijun¹, HAN Suna², WANG Xian³,
SUN Xiyu^{1,4}, PAN Chunmei¹

1. 河南牧业经济学院 食品与生物工程学院(酒业学院)/河南省白酒风格工程技术研究中心/郑州市白酒酿造微生物技术重点实验室, 河南 郑州 450046;
 2. 河南仰韶酒业有限公司 博士后科研工作站, 河南 澠池 472400;
 3. 赊店老酒股份有限公司, 河南 社旗 473300;
 4. 河南张弓老酒酒业有限公司, 河南 宁陵 476733
1. College of Food and Biological Engineering (Liquor College)/He'nan Liquor Style Engineering Technology Research Center/Zhengzhou Key Laboratory of Liquor Brewing Microbial Technology, He'nan University of Animal Husbandry and Economy, Zhengzhou 450046, China;
 2. Postdoctoral Programme, He'nan Yangshao Liquor Co., Ltd., Mianchi 472400, China;
 3. SheDianLaoJiu Co., Ltd., Sheqi 473300, China;
 4. He'nan ZhangGongLaoJiu Wine Co., Ltd., Ningling 476733, China

关键词:

包包曲; 平板曲;
理化指标;
高通量测序;
细菌群落结构

Key words:

bag Daqu; brick Daqu;
physicochemical
indexes;
high-throughput
sequencing;
bacterial community
structure

摘要:检测包包曲和平板曲的理化指标,并结合高通量测序技术分析两种曲的细菌群落结构.结果表明:包包曲和平板曲的水分含量、酸度、淀粉含量等理化指标均在成品曲的标准范围之内,与包包曲相比,平板曲的水分含量和发酵力较高且差异显著,糖化力、液化力、酯化力、发酵力、酒化力均较高且差异极显著,酸度和氨基酸态氮含量均较低且差异极显著,淀粉含量差异不明显;以平均相对丰度0.50%为阈值,包包曲和平板曲共有的优势细菌门依次为变形菌门、厚壁菌门和放线细菌门,且平板曲的优势细菌门比包包曲多一个拟杆菌门;以平均相对丰度1.00%为阈值,包包曲的优势细菌属依次为假单胞菌属、泛菌属、不动杆菌属、明串珠菌属和乳杆菌属,平板曲的优势细菌属依次为乳杆菌属、明串珠菌属、泛菌属、克雷伯氏菌属、假单胞菌属、葡萄球菌属和乳球菌属,且首次从平板曲中发现巴那斯拉菌属.

收稿日期:2021-03-29

基金项目:河南省重点研发与推广专项(科技攻关)项目(202102110130);河南省重大科技专项项目(181100211400);河南牧业经济学院博士科研启动资金项目(2018HNUAHEDF011);河南牧业经济学院重点学科项目(C3060020)

作者简介:刘延波(1983—),男,河南省孟州市人,河南牧业经济学院讲师,博士,主要研究方向为酿酒微生物.

通信作者:潘春梅(1976—),女,内蒙古自治区牙克石市人,河南牧业经济学院教授,博士,主要研究方向为微生物产品及发酵工艺.

Abstract: The physicochemical indexes of bag Daqu and brick Daqu were studied. With high-throughput sequencing technology the bacterial community structure of bag Daqu and brick Daqu samples were analyzed. The results showed that the moisture content, acidity, starch content and other physicochemical indexes of brick Daqu and bag Daqu were within the standard range of finished Daqu. Compared with bag Daqu, the moisture content and fermentation power of brick Daqu were higher and the difference was significant; the saccharification power, liquefaction power, esterification power and fermentation power brick Daqu were higher, the acidity and starch content of brick Daqu were lower and the difference was very significant; the starch content was not much different. With the average relative abundance of 0.05% as the threshold, the dominant bacteria of the bag Daqu and brick Daqu were Proteobacteria, Firmicutes and Actinobacteria. There was one more Bacteroidetes in the dominant bacteria of the brick Daqu than in bag Daqu. With the average relative abundance of 1.00% as the threshold, the predominant bacterial genus of bag Daqu were *Pseudomonas*, *Pantoea*, *Acinetobacter*, *Leuconostoc*, *Lactobacillus*, and the predominant bacterial genus of brick Daqu were *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pantoea*, *Klebsiella*, *Pseudomonas*, *Staphylococcus*, *Lactococcus*. In this study, *Barnesiella* was discovered from the brick Daqu for the first time.

0 引言

大曲是酿造白酒的重要原料,它不仅在酿酒过程中起着糖化和发酵的作用,为白酒酿造提供原动力,还为白酒提供了大量的风味物质及风味前体物质,在很大程度上影响着白酒的风格^[1-4].块状大曲根据形状分为平板曲和包包曲,其中平板曲即整个曲块为长方体,而包包曲的曲胚呈长方体,在曲胚中部的上面有似山丘般的隆起,表面积较大,培养温度范围较宽,代谢产物丰富^[5].

白酒的品质、产量及风格的形成绝大部分取决于大曲的制作工艺和品质^[6].目前大曲品质的鉴定包括感官特征、理化指标及微生物指标检验,其中理化指标主要包括大曲样品的水分含量、淀粉含量、酸度、液化力、酯化力、糖化力、发酵力等^[7].对于大曲理化指标的研究,2005年沈才洪等^[8]通过对大曲的生化、理化及感官指标的评分进行加权,建立了以数字表征大曲品质指标的判断标准.2009年谭崇尧等^[9]对比分析了用不同工艺生产的枝江大曲的理化指标及感官指标发现,包包曲理化指标中的酸度、糖化力、液化力及感官指标均优于平板曲.2017年吕亚楠等^[10]对不同培养时期的大曲进

行了部分理化指标研究发现,方沧州地区每年6~9月生产的大曲品质更佳.2019年P. H. Liu等^[11]对清香型大曲在贮存期内的理化、生化等指标的变化进行了监控,并评估各时期大曲的品质后发现,用贮存3个月的清香型大曲生产的白酒品质更佳.

大曲中含有复杂、多样的微生物,其中不同种类的真菌和细菌数量庞大,特别是细菌类群极为丰富^[12-14].细菌在白酒酿造中至关重要,其代谢产物对白酒的产率、品质等起着重要作用.传统方法在研究大曲中细菌的数量和种类上具有局限性,而分子生物技术则是对细菌进行相关研究更有力的工具,如近年来应用较多的PCR-DGGE(聚合酶链式反应-变性梯度凝胶电泳)、基因文库、高通量测序技术等^[15-16].其中,高通量测序技术作为新一代的测序技术,应用于微生物群落结构的研究,不仅通量高、灵敏度高,还可进行双向测序,且工作量小、成本低^[17].2017年王洪等^[18]运用高通量测序技术,研究分析了在热风干燥条件下大曲样品贮存期间的细菌群落结构,发现热风干燥大曲随着贮存时间的增加,细菌丰度呈先增加后减小的趋势,而细菌群落多样性呈增加的趋势.2018年李斌等^[1]运用高通量测序技术对浓香型白酒和

芝麻香型白酒大曲的微生物菌群进行研究发现,浓香型白酒中高温酒曲的优势菌群主要包括乳杆菌属(*Lactobacillus*)、魏斯氏菌属(*Weissella*)、片球菌属(*Pediococcus*)等9个属,芝麻香型白酒高温酒曲的优势菌群主要有芽孢杆菌属(*Bacillus*)和别样芽孢杆菌属(*Allobacillus*)。2019年戴奕杰等^[19]采用高通量测序技术对酱香型白酒大曲和糟醅进行细菌多样性分析发现,高温制曲与发酵酿酒阶段的优势菌属基本一致,即大曲是后续糟醅发酵的微生物来源。

中原地区酒企使用包包曲和平板曲的情况不一,关于生产用曲的选择争议较大,而目前对包包曲和平板曲的对比研究较少,且评估指标不能全面分析二者之间的差异。基于此,本研究主要对包包曲和平板曲进行感官特征和理化指标的检测,并运用高通量测序技术对包包曲和平板曲中的细菌群落结构进行研究,从品质指标、细菌群落结构等方面更全面地对包包曲和平板曲进行对比分析,以期为中原地区包包曲和平板曲细菌信息数据库的建立、生产用曲的选择及大曲的制作提供科学依据,并进一步提升白酒的品质,推动白酒行业的创新性发展。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

1.1.1 大曲样品 包包曲和平板曲样品,均由河南赊店老酒股份有限公司生产制作。各取3块样品,将曲心、曲皮混匀,粉碎后过20目筛,一部分密封贮存于4℃冰箱中,用于大曲感官特征和理化指标的检测,另一部分密封贮存于-20℃冰箱中,用于大曲高通量测序。

1.1.2 主要试剂 NaOH、无水葡萄糖、无水乙醇、可溶性淀粉、碘、KI,天津市科密欧化学试剂有限公司产;H₂SO₄、HCl,天津市永大化学试剂有限公司产;甲醛,天津市盛奥化学试剂有限公司产;酒石酸钾钠、CuSO₄·5H₂O,成都金山化

学试剂有限公司产;邻苯二甲酸氢钾,天津市致远化学试剂有限公司产。以上试剂均为分析纯。E. Z. N. ATM Mag-Bind Soil DNA Kit 试剂盒,美国 Omega 公司产;Qubit3.0 DNA 检测试剂盒,美国 Life 公司产;2×Taq Master Mix,南京诺唯赞生物科技有限公司产;MagicPure Size Selection DNA Beads,北京全式金生物技术有限公司产。

1.2 主要仪器与设备

SW-CJ-2F 型双人双面净化工作台,苏州净化设备有限公司产;FA1104 型分析天平(感量为 0.000 1 g),上海舜宇恒平科学仪器有限公司产;PHS-25 型精密 pH 计,上海雷磁有限公司产;HH-6 型数显恒温水浴锅,方科仪器(常州)有限公司产;DNP-9272BS-III 型电热恒温培养箱,上海新苗医疗器械制造有限公司产;LDZX-50KBS 型立式蒸汽灭菌锅,上海申安医疗器械厂产;ST16R 型高速冷冻离心机,北京众力挽生物科技有限公司产;GL88-B 型漩涡混合器,海门市其林贝尔仪器制造有限公司产;TND03-H-H 型混匀干式恒温器,深圳拓能达科技有限公司产;DYY-6C 型电泳仪电源、DYCZ-21 型电泳槽,北京市六一生物技术有限公司产;GelDoc-ItS 型凝胶成像系统,美国 UVP 公司产;Qubit[®] 3.0 型荧光计,美国 Invitrogen 公司产;GeneAmp[®] 9700 型 PCR 仪,赛默飞世尔科技(中国)有限公司产。

1.3 实验方法

1.3.1 大曲感官特征检测 由5位制曲经验丰富的专业人士,从外观、断面、气味等方面对大曲进行感官特征检测。在自然光下目测其颜色、裂缝、挂衣、光洁度等外部特征;将曲块断开,在自然光下目测其菌丝、杂菌、颜色等断面特征^[8];在室温、无异味的环境下用嗅觉判断是否有扑鼻的复合曲香味或其他酸臭等异味^[20]。

1.3.2 大曲理化指标检测 大曲的水分含量、

酸度、淀粉含量、氨基酸态氮含量、糖化力、液化力、酯化力、发酵力、酒化力等理化指标的检测参考 QB/T 4257—2011^[21]。

1.3.3 大曲细菌 DNA 提取及 PCR 扩增 利用 E. Z. N. ATM Mag-Bind Soil DNA Kit 试剂盒提取大曲中的细菌 DNA, 采用琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 的完整性。

PCR 扩增 V3-V4 区域, 引物为 341F (5'-CCCTACACGACGCTCTTCCGATCTG (barcode) CCTACGGGNGGCWGCAG-3') 和 805R (5'-GACTGGAGTTCCTTGGCACCCGAGAATTCCAGACTAC-HVGGGTATCTAATCC-3')。第 1 轮扩增体系为: 15 μ L 2 \times Taq master Mix, 1 μ L Bar-PCR primer F (10 μ mol/L), 1 μ L Primer R (10 μ mol/L), 10~20 ng 基因组 DNA, 加水至 30 μ L。反应程序为: 94 $^{\circ}$ C 预变性 3 min, 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 45 $^{\circ}$ C 退火 20 s, 65 $^{\circ}$ C 延伸 30 s (进行 5 个循环); 94 $^{\circ}$ C 变性 20 s, 55 $^{\circ}$ C 退火 20 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 30 s (进行 20 个循环); 72 $^{\circ}$ C 保持 5 min; 10 $^{\circ}$ C 保存。第 2 轮扩增体系为: 15 μ L 2 \times Taq master Mix, 1 μ L Primer F (10 μ mol/L), 1 μ L Primer R (10 μ mol/L), 20 ng PCR 产物 (上一轮), 加水至 30 μ L。反应程序为: 95 $^{\circ}$ C 预变性 3 min, 94 $^{\circ}$ C 变性 20 s, 55 $^{\circ}$ C 退火 20 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 20 s (进行 5 个循环); 72 $^{\circ}$ C 保持 5 min; 10 $^{\circ}$ C 保存。PCR 扩增结束后进行 DNA 纯化回收, 利用 Qubit3.0 DNA 检测试剂盒对回收的 DNA 进行精确定量, 按照 1:1 等体积混合。

1.3.4 高通量测序与数据统计分析 等体积混合后的 DNA 样品由生工生物工程(上海)股份有限公司进行高通量测序, 并通过数据统计分析、OTU (Operational Taxonomic Units, 操作分类单元) 分析 (利用 Usearch 软件在 97% 的相似水平上进行 OTU 聚类分析)、Alpha 多样性分析 (利用 Mothur 软件对各个样品进行 Alpha 多样性分析)、物种分类学分析、系统发生进化树分析、物种丰度差异分析、PICRUSt 功能分析 (基

于 COG 的功能分析, 利用 R 软件对结果进行作图, 得到功能预测) 等对包包曲和平板曲的细菌菌落结构进行分析。

2 结果与分析

2.1 包包曲与平板曲的感官特征分析

从大曲厂房中取样的包包曲和平板曲样品如图 1 所示。由图 1 可知, 包包曲和平板曲在外观、断面、香味等指标上都极为相似: 外观上, 均挂衣整齐均匀, 颜色整体呈灰白色, 有少许裂口, 表面较光滑; 断面上, 均整齐, 有泡气, 菌丝丰富且分布均匀; 香味上, 均具有较浓郁的曲香, 无异味。从感官特征上看, 包包曲和平板曲均属于高品质大曲, 可以进行更深一步的比较研究。

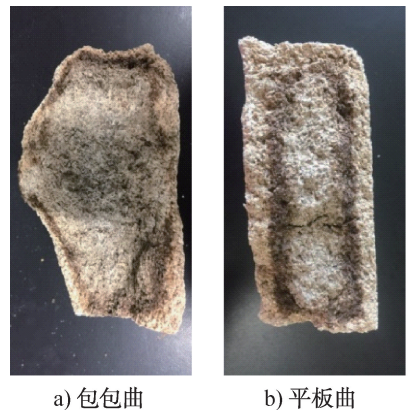


图 1 包包曲和平板曲样品

Fig. 1 Samples of bag Daqu and brick Daqu

2.2 包包曲与平板曲理化指标检测结果分析

包包曲和平板曲的理化指标测定结果如表 1 所示。由表 1 可知, 包包曲和平板曲的水分含量、酸度、淀粉含量均在成品曲的标准范围之内^[22]。在制曲过程中, 水分与微生物生长及酶系活力联系紧密, 也是大曲培养及贮存的关键^[23]。与包包曲相比, 平板曲的水分较高且差异显著 ($P < 0.05$)。这可能是因为包包曲的制曲温度 (60~63 $^{\circ}$ C) 比平板曲的制曲温度 (57~60 $^{\circ}$ C) 高, 有利于水分蒸发, 导致包包曲的水分含量较低。淀粉含量越低, 说明大曲中的微生物

表 1 包包曲和平板曲的理化指标测定结果

Table 1 Measurement results of physicochemical indexes of bag Daqu and brick Daqu

样品	水分含量/%	酸度/ (mmol·(10 g) ⁻¹)	淀粉含量/ (g·(100 g) ⁻¹)	氨基酸态氮 含量/(g·kg ⁻¹)	糖化 力/U	液化 力/U	酯化 力/U	发酵 力/U	酒化力(以酒精 度表示,%/vol)
包包曲	10.22± 0.10	1.21± 0.01	54.36± 0.05	4.89± 0.01	161.20± 0.92	0.20± 0.01	339.01± 0.28	0.10± 0.00	11.71±0.06
平板曲	10.51± 0.08	0.90± 0.01**	54.39± 0.08	3.68± 0.01**	489.60± 0.60**	0.36± 0.01**	367.01± 0.28**	0.28± 0.01*	12.60±0.06**

注: *表示差异显著($P<0.05$), **表示差异极显著($P<0.01$).

对淀粉的利用率越高,微生物代谢越旺盛^[24],本研究中包包曲和平板曲的淀粉含量无显著差异.酸度也能反映大曲中微生物的新陈代谢情况,本研究中平板曲的酸度和氨基酸态氮含量较包包曲低且差异极显著($P<0.01$).糖化力、酯化力、液化力、发酵力和酒化力是反映大曲品质的重要指标,其中酯化力越高越有利于白酒中风味物质的形成,而发酵力包含了糖化、液化等一系列复杂过程,发酵力和酒化力均能反映大曲的产酒能力^[25].本研究中平板曲的糖化力、液化力、酯化力、发酵力均在成品曲的标准范围之内,而包包曲除了发酵力低于标准范围外,其余理化指标均在成品曲标准范围之内.与包包曲相比,平板曲的糖化力、液化力、酯化力、发酵力和酒化力均较高,除发酵力差异显著外($P<0.05$),其余指标均差异极显著($P<0.01$).本研究中包包曲的制曲温度比平板曲的制曲温度高,而温度是影响糖化力的主要因素,一般情况下低温曲比高温曲的糖化力高^[26],这也是平板曲比包包曲糖化力高的原因之一.

2.3 包包曲与平板曲细菌群落结构分析

2.3.1 高通量测序结果分析

本实验用于测序的序列中含有用来识别和区分样品的标签序列,表明本实验的测序序列为有效序列.包包曲和平板曲样本的数据通过标签序列得到,对包包曲和平板曲的样本数据进行质控过滤后,包包曲剩余序列数目为 84 946 个,原始序列平均长度为 429.45 bp;平板曲的剩余序列数目为 77 610 个,原始序列平均长度为 421.57 bp.

PCR 扩增后,包包曲和平板曲产生的嵌合体数目分别为 1508 个和 109 个,为保证测序数据信息的分析质量,对序列进行剔除及错误校正处理后,包包曲和平板曲剩余序列数目分别为 82 082 个和 51 537 个.

2.3.2 OTU 分析

OTU 聚类分析得到包包曲的 OTU 数目为 347 个,平板曲的 OTU 数目为 451 个.运用 R 语言程序包 VennDiagram 软件对包包曲和平板曲进行评估,得到包包曲特有的 OTU 数目为 178 个,平板曲特有的 OTU 数目为 282 个,二者共有的 OTU 数目为 169 个.

2.3.3 Alpha 多样性分析

通过 Alpha 值可以估计样品中细菌群落物种的丰度和多样性,运用 Mothur 软件对包包曲和平板曲进行的细菌群落 Alpha 多样性分析,结果如表 2 所示.通常用于微生物群落多样性描述的 Alpha 多样性指数包括 Shannon 指数^[27]、Chaol 指数、Coverage 指数和 Simpson 指数^[28].其中最为敏感的是 Shannon 指数,其数值越大,代表物种的丰富度越高,而 Simpson 指数越大,群落的多样性则越低.由表 2 可知,与包包曲相比,平板曲的 Shannon 指数和 Chaol 指数均较高,而 Simpson 指数较低,说明平板曲中的细菌群落物种的丰度和多样性比包包曲高.这是因为温度过高易导致不耐高温的微生物死亡,加之高温易造成细胞水分流失,故平板曲的细菌数量比包包曲多,其水分含量也较包包曲高.除此之外,北方地区气候干燥且空气湿度小,而包包曲的曲胚上面有隆起,比表面积较大,水分挥发较快,而水分是

表2 包包曲和平板曲的细菌群落 Alpha 多样性指数

Table 2 Bacterial Alpha diversity index of bag Daqu and brick Daqu

样品	Seq 数目/个	OUT 数目/个	Shannon 指数	Chao1 指数	Coverage 指数	Simpson 指数
包包曲	80 184	347	1.384 709	533.428 571	0.998 192	0.540 591
平板曲	50 301	451	1.991 524	606.180 723	0.996 799	0.360 743

微生物生长的主要因素之一,水分的减少也会导致细菌的数量减少^[29-30].大曲样品的文库覆盖率 Coverage 指数能够反映实验取样是否合理,其数值越大,样品中未被测出序列的概率越小,一般情况下,Coverage 指数>97%被认为实验取样是合理的.由表2可知,两个样品的 Coverage 指数均>99%,证明本实验取样合理.以 Shannon 指数为例,随机抽取测序序列,并与其所代表的 OTU 数目构建的 Alpha 指数稀释曲线如图2所示.由图2可知,两条曲线均趋于平坦,说明本实验的测序数据量选取合理.

2.3.4 物种分类学分析 将得到的所有 OTU 与数据库进行比对,选择相似度在 97% 以上的序列进行物种分类,获得各个 OTU 的分类水平,即门、纲、目、科、属分类水平.基于高通量测

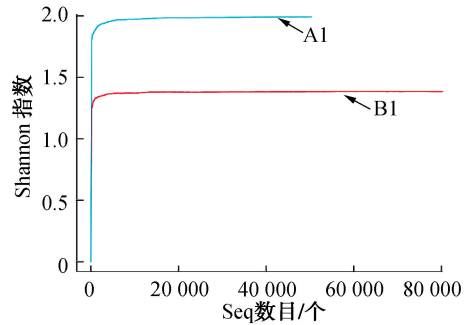


图2 包包曲(A1)和平板曲(B1)的 Alpha 指数稀释曲线图

Fig. 2 Alpha index dilution curve of bag Daqu(A1) and brick Daqu(B1)

序技术,包包曲和平板曲在门和属水平上的细菌群落结构分布如图3和图4所示.

由图3可知,从门水平上分析,包包曲中含有的平均相对丰度>0.50%的优势细菌门包括变形菌门(Proteobacteria, 94.85%)、厚壁菌门(Firmicutes, 4.10%)和放线细菌门(Actinobacteria,

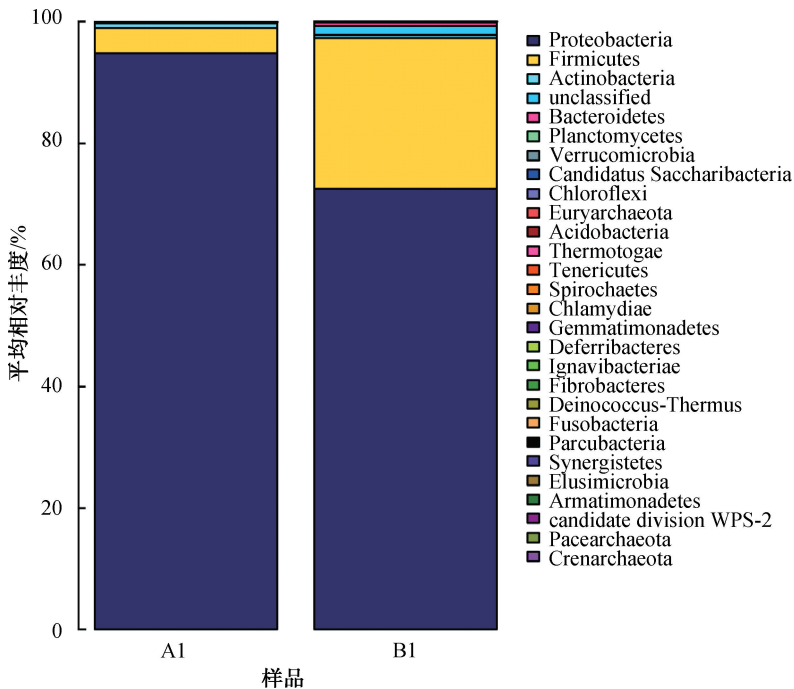


图3 包包曲(A1)和平板曲(B1)在门水平上的细菌群落结构分布图

Fig. 3 Distribution of bacterial community structure of bag Daqu(A1) and brick Daqu(B1) at the door level

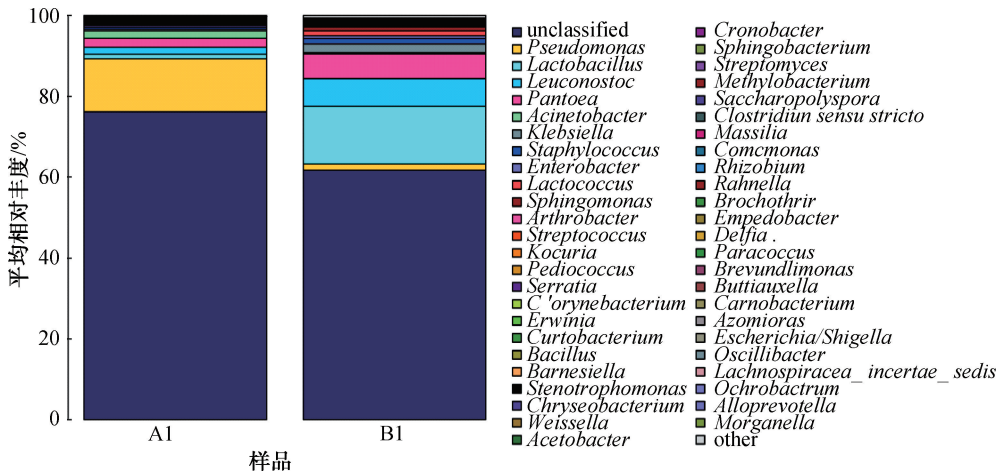


图4 包包曲(A1)和平板曲(B1)在属水平上的细菌群落结构分布图

Fig. 4 Distribution of bacterial community structure of bag Daqu (A1) and brick Daqu (B1) at the genus level

0.80%),非优势菌门为拟杆菌门(Bacteroidetes, 0.19%)和未分类细菌门(unclassified, 0.05%)。平板曲中除去未分类细菌门(unclassified, 1.50%),平均相对丰度>0.50%的优势细菌门包括变形菌门(Proteobacteria, 72.52%)、厚壁菌门(Firmicutes, 24.77%)、拟杆菌门(Bacteroidetes, 0.58%)和放线细菌门(Actinobacteria, 0.55%),非优势菌门为疣微菌门(Verrucomicrobia, 0.04%)、浮霉菌门(Planctomycetes, 0.04%)、Candidatus Saccharibacteria(0.01%)。即两个样品中共有的优势细菌门为变形菌门(Proteobacteria)、厚壁菌门(Firmicutes)和放线细菌门(Actinobacteria),且平板曲的优势细菌门比包包曲多一个拟杆菌门(Bacteroidetes)。本研究发现的优势细菌门与陈玲等^[31]运用PCR-ARDAR和16S rRNA基因克隆测序技术研究的浓香型白酒大曲的优势细菌门基本相同,且本研究所检测到的细菌门在数量上比其多3个。与姚粟等^[32]运用16S rDNA克隆文库方法研究的芝麻香型高温大曲中的优势细菌门基本一致,且本研究在其基础上还发现了拟杆菌门(Bacteroidetes)、疣微菌门(Verrucomicrobia)、浮霉菌门(Planctomycetes)等多个菌门。

由图4可知,从属水平上分析,包包曲中除去未分类细菌属(unclassified, 76.15%),平均

相对丰度>1.00%的优势细菌属包括假单胞菌属(*Pseudomonas*, 13.17%)、泛菌属(*Pantoea*, 2.17%)、不动杆菌属(*Acinetobacter*, 1.78%)、明串珠菌属(*Leuconostoc*, 1.78%)和乳杆菌属(*Lactobacillus*, 1.10%),非优势细菌属包括葡萄球菌属(*Staphylococcus*, 0.53%)、克雷伯氏菌属(*Klebsiella*, 0.44%)、肠杆菌属(*Enterobacter*, 0.42%)、节杆菌属(*Arthrobacter*, 0.33%)、链球菌属(*Streptococcus*, 0.32%)、考克氏菌属(*Kocuria*, 0.23%)、棒状杆菌属(*Corynebacterium*, 0.15%)、乳球菌属(*Lactococcus*, 0.14%)、欧文菌属(*Erwinia*, 0.12%)、沙雷菌属(*Serratia*, 0.10%)、寡养单胞菌属(*Stenotrophomonas*, 0.10%)、鞘氨醇单胞菌属(*Sphingomonas*, 0.09%)、金黄杆菌属(*Chryseobacterium*, 0.09%)、芽孢杆菌属(*Bacillus*, 0.08%)和其他细菌属(0.72%)。平板曲中除去未分类细菌属(unclassified, 61.73%),平均相对丰度>1.00%的优势细菌属包括乳杆菌属(*Lactobacillus*, 14.32%)、明串珠菌属(*Leuconostoc*, 6.84%)、泛菌属(*Pantoea*, 6.07%)、克雷伯氏菌属(*Klebsiella*, 2.16%)、假单胞菌属(*Pseudomonas*, 1.52%)、葡萄球菌属(*Staphylococcus*, 1.37%)和乳球菌属(*Lactococcus*, 1.12%),非优势细菌属包括鞘氨醇单胞菌属(*Sphingomonas*, 0.99%)、

肠杆菌属 (*Enterobacter*, 0.70%)、不动杆菌属 (*Acinetobacter*, 0.33%)、片球菌属 (*Pediococcus*, 0.29%)、巴那斯拉菌属 (*Barnesiella*, 0.19%)、短小杆菌属 (*Curtobacterium*, 0.19%)、醋酸杆菌属 (*Acetobacter*, 0.12%)、芽孢杆菌属 (*Bacillus*, 0.11%)、沙雷菌属 (*Serratia*, 0.11%)、节细菌属 (*Arthrobacter*, 0.09%)、链球菌属 (*Streptococcus*, 0.09%)、魏斯氏菌属 (*Weissella*, 0.08%) 和其他细菌属 (1.57%)。其中,巴那斯拉菌属 (*Barnesiella*) 是首次从平板曲中发现的细菌属。本研究发现的优势细菌属与吴树坤等^[33] 利用高通量测序技术发现的四川地区浓香型大曲中的优势细菌属,以及李斌等^[1] 运用高通量测序技术发现的浓香型大曲中的优势细菌属基本一致。

在属水平上,包包曲和平板曲与菌属物种之间的对应关系如图 5 所示。由图 5 可知包包曲和平板曲的优势菌属的组成比例及不同优势菌属在各大曲样本上的分布比例。

2.3.5 系统发生进化树分析 在属水平上,通过 Muscle 软件将包包曲和平板曲样品中丰

度较大的前 50 个 OTU 代表序列与数据库中的序列进行聚类比对分析,构建的系统发生进化树如图 6 所示。由图 6 可清晰、系统地揭示包包曲和平板曲细菌群落及各菌株进化的过程顺序。

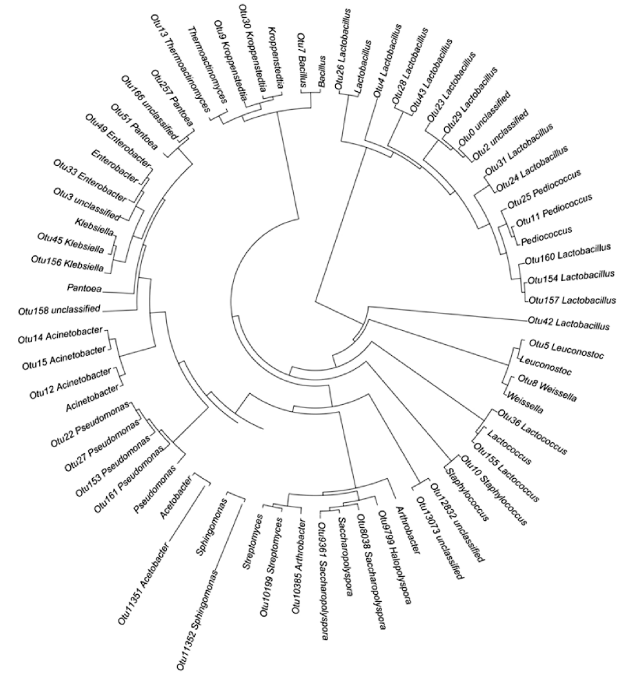


图 6 丰度较大的前 50 个 OTU 在属水平上的系统发生进化树

Fig. 6 Cluster diagram of the top 50 OTUs with the highest abundance at the genus level

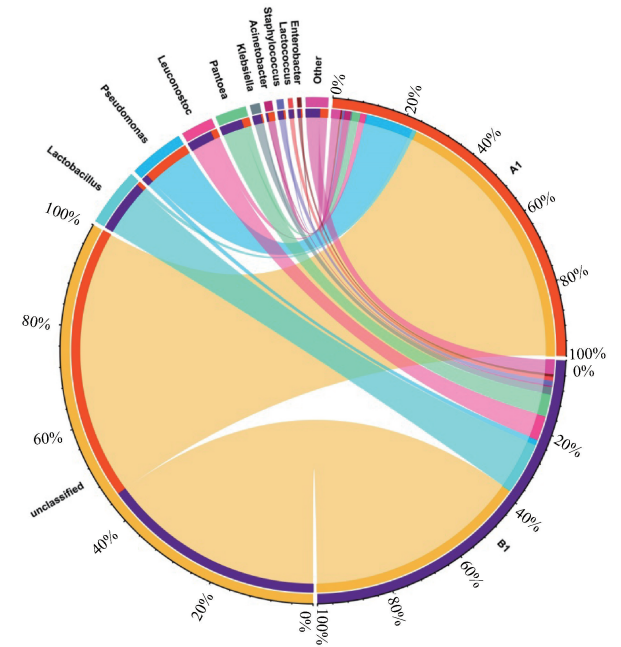


图 5 属水平上包包曲(A1)和平板曲(B1)与菌属物种的关系图

Fig. 5 Species relationship map of bag Daqu(A1) and brick Daqu(B1) at the genus level

2.3.6 物种丰度差异分析 在物种分类的基础上,对包包曲和平板曲的菌群丰度进行了差异分析,包包曲与平板曲的细菌属丰度差异显著的误差线图如图 7 所示。由图 7 可知,除未分类细菌属外,包包曲与平板曲细菌属丰度差异显著的细菌属共有 24 个,其中,平板曲比包包曲明显增多的细菌属包括乳杆菌属、明串珠菌属、泛菌属、克雷伯氏菌属、鞘氨醇单胞菌属、乳球菌属、葡萄球菌属、巴那斯拉菌属、片球菌属、短小杆菌属、醋酸杆菌属、狭义梭菌属 (*Clostridium sensu stricto*)、肠杆菌属、*Methylobacterium* 和 *Buttiauxella*。其中乳杆菌属在白酒酿造过程中能促进发酵及美拉德反应,具有维护和保持酿酒微生态环境平衡的作用,其代谢产物乳酸可

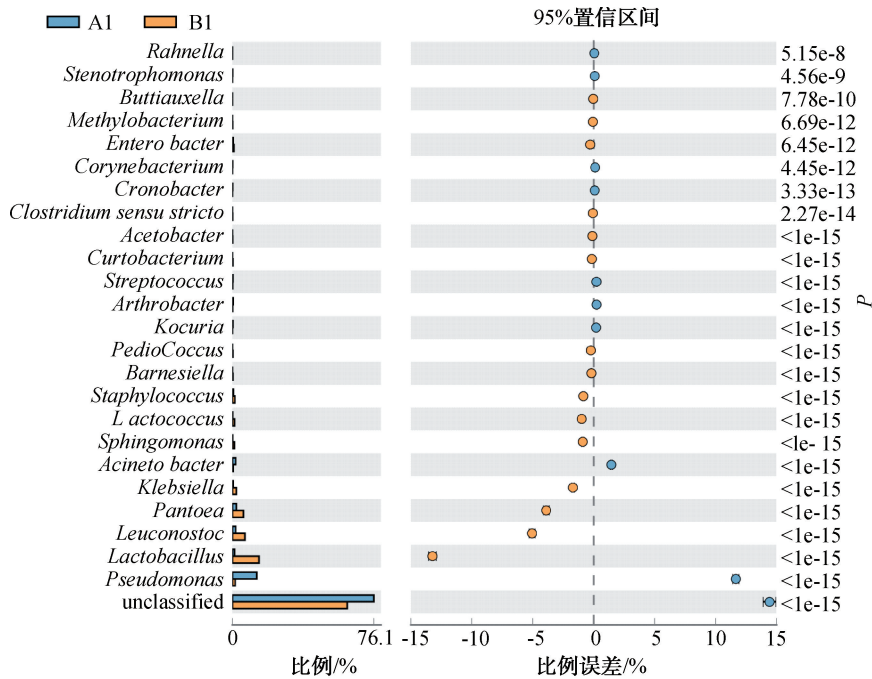


图7 包包曲(A1)和平板曲(B1)菌属丰度差异显著的误差线图

Fig. 7 Error plot of the significant difference between bag Daqu (A1) and brick Daqu (B1)

形成乳酸乙酯和其他香味物质,同时还具有增加酒体醇厚度和回甜感、降低刺激感、延长后味等作用^[34-35].明串珠菌属利用葡萄糖,通过异性乳酸发酵产生的D型乳酸和醋酸是乳酸乙酯和乙酸乙酯的重要前体物质.醋酸杆菌属中产生的醋酸是丁酸乙酯和己酸乙酯的前体物质^[36].克雷伯氏菌属中具有可以产生脂肪酶的菌种,对白酒增香具有重要作用^[37].平板曲中克雷伯氏菌属明显增多也是平板曲比包包曲酯化力高的原因之一.另外,鞘氨醇单胞菌属可以降解有毒物质^[38].

包包曲比平板曲明显增多的细菌属包括假单胞菌属、不动杆菌属、寡养单胞菌属、拉恩菌属(*Rahnella*)、克罗诺杆菌(*Cronobacter*)、棒状杆菌属、考克氏菌属、节细菌属、和链球菌属.孟天毅等^[39]研究发现,假单胞菌属属于耐热性较强的细菌,温度升高会导致不耐热的细菌减少,而耐热菌成为优势菌,这与本研究得到的包包曲中优势菌属为假单胞菌属的结果一致;而肠杆菌属的耐热性较低^[40],在制曲过程中,高温

可致其失活,所以平板曲中的肠杆菌属数量多于包包曲.

2.3.7 PICRUST 功能分析 为了获知包包曲和平板曲更高层级水平上的功能情况,将其与COG数据库进行比对及功能注释,得到的功能结构分布柱状图如图8所示,两个样品一共涉及25个COG功能分类.包包曲与平板曲菌基于COG功能结构的误差线图如图9所示.由图8和图9可知,包包曲和平板曲丰度差异显著的($P < 0.05$)功能有23个.其中,平板曲比包包曲明显增多的功能主要有细胞和信号功能(细胞周期控制、细胞分裂、染色体分配、细胞壁/膜/包膜生物发生、防御机制、细胞骨架等)、代谢功能(核苷酸转运和代谢、碳水化合物的转运和代谢、辅酶转运和代谢、无机离子转运和代谢等)、信息存储和处理功能(翻译、转录、核糖体结构和生物发生)等.平板曲中数量丰富、代谢旺盛的微生物之间相互作用,促进各反应的生成,导致平板曲的糖化力、液化力、酯化力、发酵力和酒化力均比包包曲高.

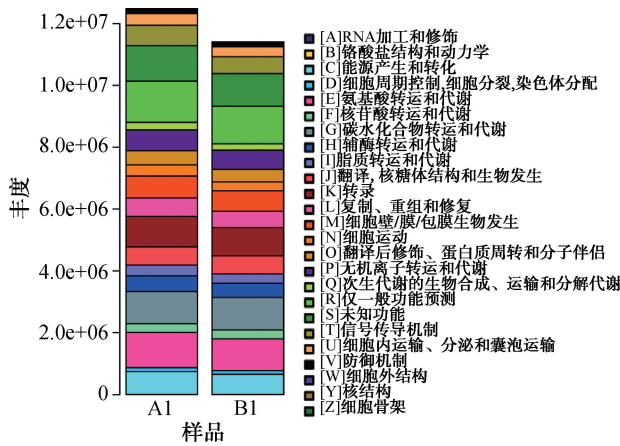


图 8 包包曲(A1)和平板曲(B1)基于COG的功能结构分布柱状图
 Fig. 8 The bar chart of the functional structure distribution of bag Daqu (A1) and brick Daqu(B1) based on COG

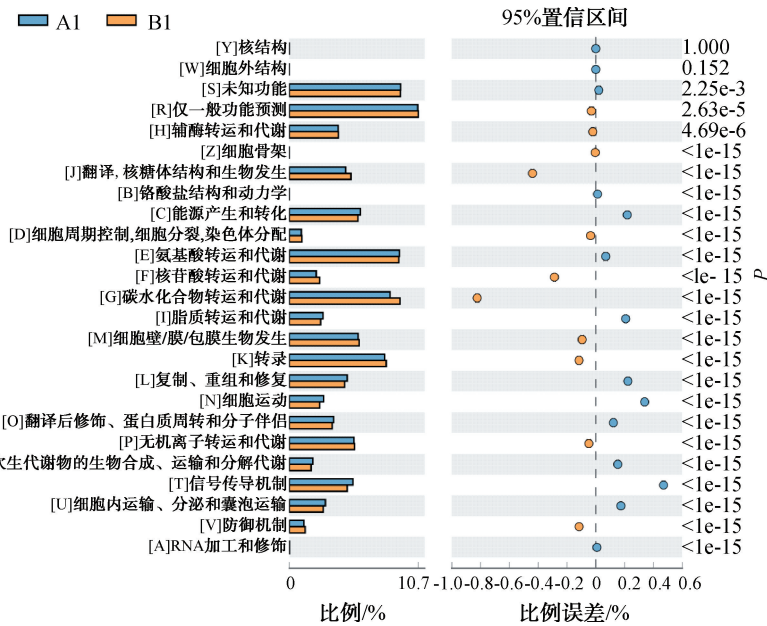


图 9 包包曲(A1)和平板曲(B1)基于COG的功能结构差异误差线图

Fig. 9 Functional structure difference error line of bag Daqu (A1) and brick Daqu(B1) based on COG

3 结论

本文通过对包包曲和平板曲的感官特征和理化指标的检测分析发现,二者均属于高品质大曲,且平板曲的水分含量、糖化力、液化力、酯化力、发酵力、酒化力均比包包曲高,而酸度和氨基酸态氮含量均比包包曲低.应用高通量测序技术对包包曲和平板曲的细菌群落结构进行分析,结果表明:从门水平上分析,包包曲中的优势细菌门(平均相对丰度>0.50%)有3个,

依次为变形菌门、厚壁菌门和放线细菌门;平板曲中的优势细菌门(平均相对丰度>0.50%)有4个,依次为变形菌门、厚壁菌门、拟杆菌门和放线细菌门;从属水平上分析,包包曲中的优势细菌属(平均相对丰度>1.00%)有5个,依次为假单胞菌属、泛菌属、不动杆菌属、明串珠菌属和乳杆菌属;平板曲的优势细菌属(平均相对丰度>1.00%)有7个,依次为乳杆菌属、明串珠菌属、泛菌属、克雷伯氏菌属、假单胞菌属、葡萄球菌属和乳球菌属,且首次从平板曲中发现

了巴那斯拉菌属.另外,通过高通量测序还发现,平板曲的细菌群落丰度及多样性均比包包曲高,表明在中原地区白酒的酿造过程中使用平板曲的效果优于包包曲.本研究为中原地区制作的包包曲和平板曲建立了细菌信息数据库,可为中原地区白酒品质的提升及创新性发展提供理论依据和参考.

参考文献:

- [1] 李斌,闫志鹏,李慧星,等.基于高通量测序技术的浓香型和芝麻香型白酒酒曲细菌群落结构分析[J].中国酿造,2018,37(8):148.
- [2] 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.
- [3] 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.
- [4] 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.
- [5] 马加军,吕月明.包包曲生产工艺条件控制[J].酿酒科技,2011(11):92.
- [6] 吕云怀,王莉,汪地强,等.不同香型白酒大曲风味物质与其产品风格特征关系的分析[J].酿酒科技,2012(7):72.
- [7] 何宏魁,李兰,汤有宏,等.古井贡酒大曲感官评价与其微生物、理化指标的关系研究[J].酿酒,2017,44(1):58.
- [8] 沈才洪,张良,应鸿,等.大曲质量标准体系设置的探讨[J].酿酒科技,2005(11):8.
- [9] 谭崇尧,徐军,王令.对枝江大曲不同工艺曲的质量研究[J].酿酒科技,2009(2):58.
- [10] 吕亚楠,沙均响.不同培养时期对中高温大曲理化指标影响的研究[J].酿酒,2017,44(6):67.
- [11] LIU P H, ZHANG L H, DU X W, et al. Dynamic analysis of physicochemical and biochemical indices and microbial communities of light-flavor Daqu during storage [J]. Journal of the American Society of Brewing Chemists, 2019, 77(4): 287.
- [12] WANG C L, SHI D J, GONG G L. Microorganisms in Daqu: a starter culture of Chinese Mao-tai-flavor liquor [J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2008, 24(10): 2183.
- [13] FAN G S, SUN B G, FU Z L, et al. Analysis of physicochemical indices, volatile flavor components, and microbial community of a light-flavor Daqu [J]. Journal of the American Society of Brewing Chemists, 2018, 76(3): 209.
- [14] ZHANG H M, HE H K, YU X J, et al. Employment of near full-length ribosome gene TA-cloning and primer-blast to detect multiple species in a natural complex microbial community using species-specific primers designed with their genome sequences [J]. Molecular Biotechnology, 2016, 58(11): 729.
- [15] 张双燕,廖永红,纪南,等.基于高通量测序技术分析北京清香型大曲微生物多样性[J].中国酿造,2016,35(11):49.
- [16] 王勇,周森,魏金旺.基于高通量测序技术分析牛栏山大曲微生物多样性[J].中国酿造,2019,38(2):58.
- [17] WANG X D, BAN S D, HU B D, et al. Bacterial diversity of Moutai-flavour Daqu based on high-throughput sequencing method [J]. Journal of the Institute of Brewing, 2017, 123(1): 138.
- [18] 王洪,罗惠波,周平,等.热风干燥大曲在贮存期细菌群落结构的变化[J].现代食品科技,2017,33(11):89.
- [19] 戴奕杰,李宗军,田志强.酱香型白酒大曲和

- 糟醅的细菌多样性分析[J]. 食品科学, 2019, 40(4):152.
- [20] 马茹菲, 马玉帛, 佟世生, 等. 不同清香型大曲理化生化指标和挥发性成分分析[J]. 酿酒科技, 2019(3):70.
- [21] 中华人民共和国工业和信息化部. 酿酒大曲通用分析方法:QB/T 4257—2011[S]. 北京: 中国标准出版社, 2011.
- [22] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局, 中国国家标准化管理委员会. 白酒分析方法:GB/T 10345—2007[S]. 北京: 中国标准出版社, 2007.
- [23] 张丽, 卢红梅, 陈莉, 等. 酱香型大曲贮存过程中发酵性能变化的研究[J]. 现代食品科技, 2017, 33(9):231.
- [24] 李超, 穆琳, 王建耀, 等. 汾型大曲的理化指标和微生物指标分析[J]. 中国酿造, 2009(1):140.
- [25] 李媛媛, 罗碧霞, 张兰兰, 等. 不同粮食曲的理化特性及其微生物群落结构研究[J]. 食品与发酵工业, 2020, 46(10):74.
- [26] 涂荣坤, 钱志伟, 秦辉, 等. 大曲检测指标研究进展[J]. 酿酒科技, 2016(1):110.
- [27] CHAO A, JOST L, HSIEH T C, et al. Expected Shannon entropy and Shannon differentiation between subpopulations for neutral genes under the finite island model[J]. PLOS ONE, 2015, 10(6):1.
- [28] ERCOLINI D. High-throughput sequencing and metagenomics: moving forward in the culture-independent analysis of food microbial ecology [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2013, 79(10):3148.
- [29] 陶寅亮. 北方中高温包包曲制曲过程关键控制点分析[J]. 现代食品, 2016(3):120.
- [30] 雷学俊, 张霞, 刘多涛, 等. 包包曲及制曲环境中可培养霉菌的分离与鉴定[J]. 酿酒科技, 2019(12):17.
- [31] 陈玲, 曾丽云, 袁玉菊, 等. 浓香型白酒大曲与入窖糟醅细菌多样性的对比分析[J]. 酿酒科技, 2015(10):39.
- [32] 姚粟, 葛媛媛, 李辉, 等. 利用非培养技术研究芝麻香型白酒高温大曲的细菌群落多样性[J]. 食品与发酵工业, 2012, 38(6):1.
- [33] 吴树坤, 谢军, 卫春会, 等. 四川不同地区浓香型大曲微生物群落结构比较[J]. 食品科学, 2019, 40(14):144.
- [34] 梁晨, 杜海, 徐岩. 大曲贮存过程中原核微生物群落结构及风味成分演替规律[J]. 微生物学通报, 2017, 44(2):384.
- [35] 康承霞, 张宿义, 马蓉, 等. 浓香型白酒大曲微生物研究进展[J]. 酿酒科技, 2017(5):88.
- [36] LI B O, XIN G, NA L, et al. Fermentation process of mulberry juice-whey based Tibetan kefir beverage production[J]. Czech Journal of Food Sciences, 2019, 36(6):494.
- [37] 翟磊, 信春晖, 许玲, 等. 芝麻香型白酒高温大曲产脂肪酶菌株的筛选与鉴定[J]. 食品与发酵工业, 2015, 41(12):36.
- [38] 黄丹, 张强, 严芳, 等. 浓香型大曲中酯化酶细菌的分离鉴定及产酶条件研究[J]. 中国酿造, 2009(8):57.
- [39] 孟天毅, 李长文, 山其木格, 等. 酱香强化大曲发酵过程中微生物的变化[J]. 酿酒科技, 2015(5):65.
- [40] 陈可丹, 吴晓江, 陈延儒, 等. 顶温对特香型大曲理化指标及菌群演替的影响[J]. 食品与发酵工业, 2020, 46(5):52.