



李亚萍, 乔海军, 贾志龙, 等. 基于宏基因组学技术的天祝藏酒大曲微生物群落多样性及功能解析[J]. 轻工学报, 2025, 40(2): 31-40.
LI Y P, QIAO H J, JIA Z L, et al. Analysis of microbial community diversity and function of Tianzhu Tibetan-flavor Daqu based on metagenomic technology[J]. Journal of Light Industry, 2025, 40(2): 31-40.
DOI: 10.12187/2025.02.004

基于宏基因组学技术的天祝藏酒大曲微生物群落多样性及功能解析

李亚萍¹, 乔海军², 贾志龙², 汪月¹, 张忠明¹, 刘琦¹, 温得林³, 张卫兵¹

1. 甘肃农业大学 食品科学与工程学院, 甘肃 兰州 730070;
2. 甘肃农业大学 理学院, 甘肃 兰州 730070;
3. 甘肃天祝藏酒酒业有限公司, 甘肃 武威 733200

摘要: 为深入研究天祝藏酒大曲的特性及其在白酒酿造过程中发挥的作用, 采用宏基因组学技术分析其微生物群落多样性, 并对其功能基因进行注释。结果表明: 从天祝藏酒大曲中鉴定出的微生物分别属于 53 个门和 835 个属, 其中优势菌门包括厚壁菌门、放线菌门和毛霉菌门, 优势菌属包括糖多孢菌属、枝芽孢杆菌属、慢生芽孢杆菌属、横梗霉属、*Desmospora*、海洋芽孢杆菌属、芽孢杆菌属、*Syncephalastrum* 和链霉菌属。在 KEGG 二级水平上共注释到 22 条代谢通路, 其中碳水化合物代谢和氨基酸代谢功能较突出, 且糖酵解/糖异生及甘氨酸、丝氨酸和苏氨酸代谢最旺盛; 糖基转移酶和糖苷水解酶被 CAZy 数据库注释到的基因较多, 分别占总基因数目的 40.49% 和 39.09%。

关键词: 天祝藏酒大曲; 宏基因组学技术; 微生物群落; 多样性; 功能基因

中图分类号: TS261.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 2096-1553(2025)02-0031-10

0 引言

“曲为酒之骨”, 大曲在白酒酿造过程中起着关键作用, 并决定着最终产品的品质^[1]。在制曲过程中, 原料、水、空气和环境中的微生物经过自发培养形成稳定的微生物群落^[2], 这些微生物在生长代谢过程中产生的风味物质(如醇类、酯类、酸类等)对白酒独特风味的形成起着重要作用^[3]; 另外, 这些微生物代谢产生的一系列酶(如淀粉酶、蛋白酶、糖

化酶等)可在白酒酿造过程中起到分解原料的作用^[4]。因此, 探究大曲的微生物群落及功能对于提高白酒品质和调控发酵过程具有重要意义。

近年来, 变性梯度凝胶电泳(DGGE)、实时聚合酶链式反应(PCR)、扩增子测序技术等分子生物学技术被广泛应用于大曲微生物研究中。例如, X. W. Zheng 等^[5]利用 DGGE 分析了我国北方和南方所产大曲中的微生物群落差异, 发现二者鸡葡萄球菌和腐生葡萄球菌的占比存在显著差异。罗爱国

收稿日期: 2024-06-21; 修回日期: 2024-10-12; 出版日期: 2025-04-15

基金项目: 国家自然科学基金项目(32460576); 甘肃省自然科学基金项目(24JRRA652, 24JRRA634); 甘肃农业大学公招博士科研启动基金项目(GAU-KYQD-2018-38)

作者简介: 李亚萍(1999—), 女, 甘肃省武威市人, 甘肃农业大学硕士研究生, 主要研究方向为酿酒工程与酿酒微生物。E-mail: 2362927951@qq.com

通信作者: 张卫兵(1974—), 男, 陕西省岐山县人, 甘肃农业大学教授, 主要研究方向为酿酒工程与酿酒微生物。E-mail: 45330301@qq.com

等^[6]利用扩增子测序技术解析了清香型堡子酒酿酒大曲微生物群落多样性,发现细菌菌群的丰富度、多样性和均匀度均较真菌菌群高,且优势细菌属主要有泛菌属、乳杆菌属、雀麦属等,优势真菌属为孢圆酵母属。但上述技术存在对测序片段的读长有限、所挖掘的微生物信息不够深入、揭示的微生物功能不够充分等不足。宏基因组学是基于所提取样品的全部微生物 DNA 构建宏基因组文库,探索微生物群落结构及多样性,进而挖掘功能基因的一门技术^[7],已成为研究微生物群落多样性及功能解析的重要手段^[8]。

天祝藏香型白酒是甘肃省特有的一类白酒,是经天祝藏酒大曲在一定条件下糖化发酵,由藏族传统工艺结合现代生产工艺生产的一种蒸馏酒,其生产流程为:以青稞为原料、天祝藏酒大曲为糖化发酵剂,经高温润粮、续渣混蒸、晾堂堆积、窖泥封顶、出窖酒醅分层缓慢蒸馏、分段量质摘酒和分级贮存,最后勾兑、调味、陈酿和罐装,发酵期为 90 d^[9]。天祝藏酒大曲是由传统藏曲土坯房培养工艺制作的中温大曲,其制曲工艺流程为:以优质大麦、小麦、青稞、豌豆、玉麦为原料,加入粉碎后的藏药材(羌活、柴胡),经润料、粉碎、拌料、装模踩曲、入室安曲、保温培菌、定期翻曲、堆曲和出曲,最后入库贮存^[9]。已有研究^[10]对藏香型系列白酒风味物质进行了检测,发现酯类和酸类物质种类较为丰富,其中己酸乙酯和辛酸乙酯对藏香型系列白酒香气风味的贡献最大;此外,张红等^[11]还从天祝藏酒大曲中筛选出一株高产蛋白酶的地衣芽孢杆菌。然而,对甘肃省特有天祝藏酒大曲的微生物群落多样

性及功能解析尚缺乏系统研究。

基于此,本文拟以天祝藏酒大曲为研究对象,利用宏基因组学技术揭示其微生物群落组成、多样性及功能,以期为天祝藏酒品质控制提供参考。

1 材料与方法

1.1 主要材料与试剂

存放 6 个月的成熟的天祝藏酒大曲,采集自甘肃天祝藏酒酒业有限公司;E. Z. N. A.® SoilDNAKit 试剂盒,美国 Omega Bio-Tek 公司。

1.2 主要仪器与设备

NanoDrop2000 型微量分光光度计、FIS#FB705220 型超声波破碎仪,美国 Thermo Fisher Scientific 公司;Quantus Fluorometer 型荧光检测仪,美国 Promega 公司;NovaSeq 6000 型测序仪,美国 Illumina 公司。

1.3 实验方法

1.3.1 天祝藏酒大曲样品采集 从曲室随机选取 30 块大曲,将每块大曲从中间平均分成 2 块后,再平均分成 4 小块,取对角的 2 块样品(如 a 和 d, b 和 c),粉碎后混匀,再按四分法将混匀后的样品摊平成圆形,取 A、D 或 B、C 部分进行混合,重复此步骤,最终缩分样品至 100 g。将每 10 块大曲所得样品合并成 1 个大曲样本,最终获得 3 组平行样本,分装于无菌自封袋中,于-20 ℃贮存,备用。采集流程如图 1 所示。

1.3.2 基因组 DNA 提取 采用 E. Z. N. A.® SoilDNAKit 试剂盒提取天祝藏酒大曲样本微生物的基因组 DNA 后,利用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 质量,采用微量分光光度计和荧光检测仪检测 DNA 的纯度和浓度。

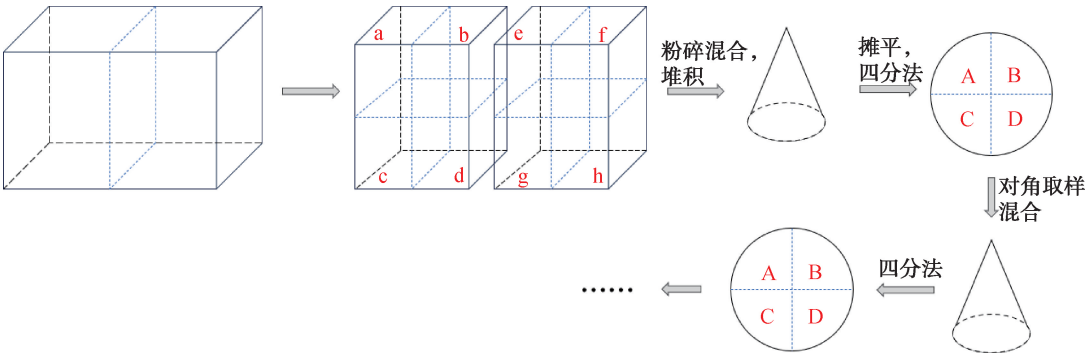


图 1 天祝藏酒大曲样品采集流程

Fig. 1 Collection process of Tianzhu Tibetan-flavor Daqu samples

1.3.3 宏基因组测序 委托北京百迈客生物科技有限公司完成宏基因组测序。测序样品的基因组 DNA 经检测合格后,使用超声波破碎仪将 DNA 随机打断成小片段,再对片段化的 DNA 进行末端修复、3'端加 A、连接测序接头、连接产物纯化片筛、文库扩增、产物纯化等程序以完成文库构建,最后进行文库定量及质量检测,检测合格后用 Illumina 测序仪进行宏基因组测序,获得原始宏基因组数据。

1.4 数据处理与分析

对测序所得原始序列 (Raw reads) 进行质量控制,使用 fastp v0.23.4 软件过滤低质量序列,得到高质量的有效序列 (Clean reads);利用 Bowtie 2 软件同宿主基因组序列比对,去除宿主污染;采用 MEGAHIT 软件进行宏基因组组装,过滤短于 300 bp 的 contig 序列;通过 MetaGeneMark 软件识别基因组中的编码区域进行基因预测;使用 MMseqs2 软件合并各样本单独的编码基因预测结果,去除冗余后得到非冗余基因集及非冗余基因丰度信息;对测序数据进行物种注释分析,获得微生物群落结构信息。此外,通过与不同数据库进行比对分析,解析天祝藏酒大曲样本的功能基因。

2 结果与分析

2.1 测序结果组装与基因预测分析

天祝藏酒大曲经宏基因组测序后,获得有效序列 $6.74 \times 10^7 \sim 7.94 \times 10^7$ 个;经宏基因组组装后,获得 contig 序列 98 348 个,N50 为 2580 bp,有效序列与 contigs 序列的比率为 98.31%。基因预测得到的基因数为 146 611 个。同时,检测到的序列覆盖率均大于 99%,表明测序深度较合理,即该深度已基本覆盖样本中的绝大多数物种。

2.2 微生物组成分析

对天祝藏酒大曲所得序列进行物种注释,共鉴定出微生物 53 个门、85 个纲、181 个目、369 个科和 835 个属。本研究统计了天祝藏酒大曲在门、属水平上相对丰度排名前十的微生物,结果如图 2 所示。当微生物的相对丰度大于 1.00%时,被认为是优势菌群^[12]。由图 2a)可知,在门水平上,天祝藏酒大

曲的优势菌门有 3 个,包括厚壁菌门 (Firmicutes, 41.14%)、放线菌门 (Actinobacteria, 22.98%) 和毛霉菌门 (Mucoromycota, 11.89%)。G. S. Fan 等^[13]研究发现,清香型白酒大曲的优势菌门主要为厚壁菌门和子囊菌门,且二者在原核生物和真核生物中的占比均超过 95%。而 N. Tian 等^[14]研究发现,十里香白酒大曲在发酵过程中的优势菌门是变形菌门和厚壁菌门,二者相对丰度占细菌群落的 75.4% 以上。

由图 2b)可知,在属水平上,天祝藏酒大曲的优势菌属有 9 个,包括糖多孢菌属 (*Saccharopolyspora*, 19.46%)、枝芽孢杆菌属 (*Virgibacillus*, 9.96%)、慢生芽胞杆菌属 (*Lentibacillus*, 5.40%)、横梗霉属 (*Lichtheimia*, 5.33%)、*Desmospora* (4.29%)、海洋芽孢杆菌属 (*Oceanobacillus*, 3.73%)、芽孢杆菌属 (*Bacillus*,

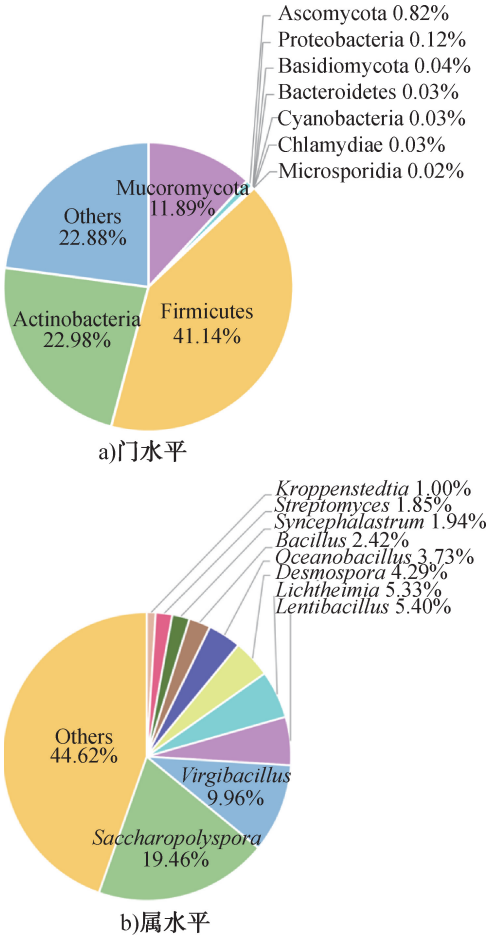


图 2 天祝藏酒大曲在门、属水平上的微生物组成

Fig. 2 Composition of microbial community in Tianzhu Tibetan-flavor Daqu at phylum and genus level

2.42%)、*Syncephalastrum* (1.94%) 和链霉菌属 (*Streptomyces*, 1.85%)。X. D. Wang 等^[15]研究发现,芽孢杆菌属、曲霉菌属和复膜孢酵母属是茅台大曲的优势菌属。Y. N. Hu 等^[16]研究发现,清香型大曲中的优势菌群为乳酸杆菌、魏斯氏菌、毕赤酵母和覆膜孢酵母属。本研究中,天祝藏酒大曲所含有的微生物在先前不同类型的大曲中均有检测到,但又存在一些差异,这可能是由大曲原材料、制曲工艺和环境条件的差异所致^[17]。

糖多孢菌属是天祝藏酒大曲的绝对优势菌属。S. P. Liu 等^[18]研究发现,糖多孢菌属与大曲中淀粉和纤维素的降解有关;同时, *Saccharopolyspora _rectivirgula* 对酒中代谢物 (包括醇类、酯类、氨基酸、有机酸等物质) 的产生具有较大贡献。枝芽孢杆菌属广泛存在于自然环境中,既能利用多种碳水化合物作为唯一碳源和能源,还能产生多种胞外酶 (如淀粉酶、蛋白酶、明胶酶等),这些胞外酶能分解淀粉、蛋白质等大分子物质,为后续酿酒过程提供必要的糖分、氨基酸等物质,进而影响白酒的风味和品质^[19]。大部分横梗霉属具有产生多种酶 (如 α -淀粉酶、糖化酶、 α -葡萄糖苷酶等) 的能力,并能赋予大曲更好的液化能力^[20]。*Desmospora* 可能是 D-塔格糖-3-差向异构酶 (D-tagatose-3-epimerase,

DTE) 家族的一个新成员,其对 d-阿洛酮糖具有较高的底物特异性,在其他大曲中也曾检测到^[21]。在白酒发酵过程中,海洋芽孢杆菌属能够产生蛋白酶、淀粉酶、纤维素酶、酯化酶等多种酶,且在一定程度上可促进大曲的酯化和糖化进程^[22]。芽孢杆菌属可分泌多种降解酶,在白酒发酵过程中可分解蛋白质、淀粉等大分子物质,进而代谢产生多种风味物质^[23]。

2.3 KEGG 数据库注释分析

基于 KEGG 数据库对天祝藏酒大曲基因进行注释,共有 2 680 295 个基因被注释,根据 KEGG 数据库一级注释,所有被注释的基因可分为四大类,包括代谢 (1 650 466 个,61.56%)、基因信息处理 (476 831 个,17.80%)、环境信息处理 (387 111 个,14.45%) 和细胞过程 (165 887 个,6.20%)。KEGG 代谢通路相关功能基因在二级水平上的统计图如图 3 所示,其中,横坐标是相应功能基因的相对含量,纵坐标是 KEGG 二级功能分类。由图 3 可知,在二级水平上共注释到 22 条代谢通路,其中,“Global and overview maps”被注释的基因数目最多,占总基因数目的 46.19%;其次是碳水化合物代谢和氨基酸代谢,分别占总基因数目的 10.24% 和 9.60%。因此,天祝藏酒大曲中的微生物群落富含涉及碳水

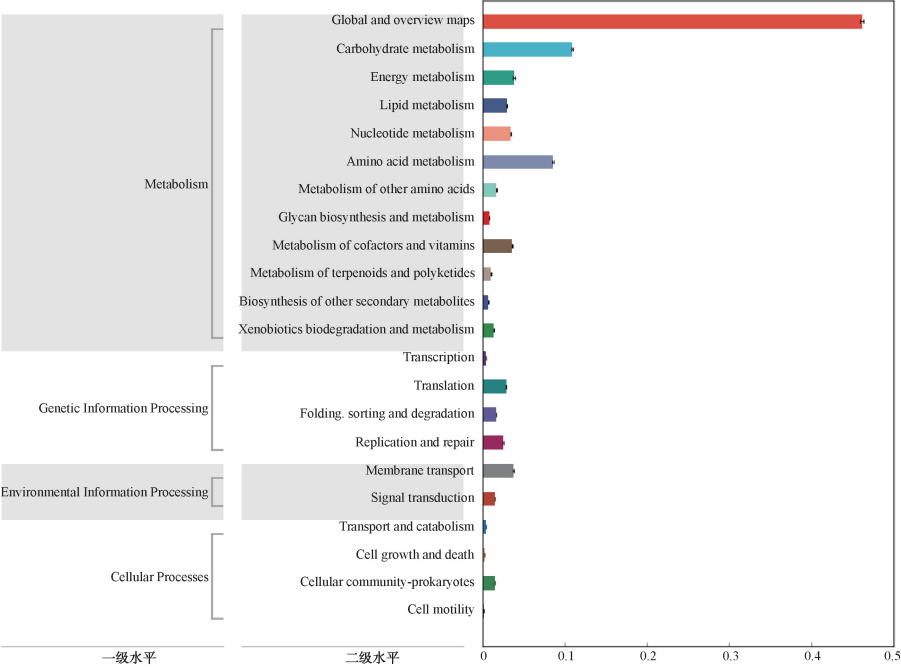


图 3 KEGG 代谢通路相关功能基因在二级水平上的统计图

Fig. 3 Statistical diagram of functional genes related to KEGG metabolic pathway at secondary level

化合物和氨基酸代谢的基因。由于大曲原料富含淀粉、蛋白质等大分子物质,大曲中的微生物可将其分解成一系列代谢产物(如氨基酸、还原糖等),这些代谢产物不仅能满足微生物的自身生长代谢,还可生成酯类、酸类等风味物质或风味前体物质,最终影响白酒的风味^[24]。

2.3.1 天祝藏酒大曲碳水化合物代谢通路分析

碳水化合物在大曲中主要为微生物提供营养^[25]。基于 KEGG 数据库,天祝藏酒大曲中共注释到与碳水化合物代谢相关的基因 484 043 个。天祝藏酒大曲碳水化合物主要代谢通路见表 1。由表 1 可知,糖酵解/糖异生途径被注释到的基因数目最多(108 726 个),这可能是因为大曲原料中富含的糖类物质经分解生成葡萄糖后,可通过糖酵解途径生成酸类、醇类、醛类等风味物质,这对大曲风味的形成具有重要作用。此外,4-磷酸赤鲜糖和磷酸烯醇式丙酮酸也能参与芳香族氨基酸的合成^[26]。

表 1 天祝藏酒大曲碳水化合物主要代谢通路
Table 1 The main metabolic pathways of carbohydrate in Tianzhu Tibetan-flavor Daqu

ko 号	KEGG-途径	基因数目/个
ko00010	糖酵解/糖异生 (Glycolysis / Gluconeogenesis)	108 726
ko00620	丙酮酸代谢 (Pyruvate metabolism)	103 002
ko00630	乙醛酸和二羧酸代谢 (Glyoxylate and dicarboxylate metabolism)	79 332
ko00520	氨基糖和核苷酸糖代谢 (Amino sugar and nucleotide sugar metabolism)	76 342
ko00640	丙酸代谢 (Propanoate metabolism)	69 826
ko00020	柠檬酸循环 (TCA 循环) (Citrate cycle (TCA cycle))	64 437
ko00030	磷酸戊糖途径 (Pentose phosphate pathway)	61 693
ko00650	丁酸代谢 (Butanoate metabolism)	54 424
ko00051	果糖和甘露糖代谢 (Fructose and mannose metabolism)	43 789
ko00500	淀粉和蔗糖代谢 (Starch and sucrose metabolism)	38 395
ko00040	戊糖和葡萄糖醛酸相互转化 (Pentose and glucuronate interconversions)	36 891
ko00052	半乳糖代谢 (Galactose metabolism)	32 805
ko00053	抗坏血酸和醛酸代谢 (Ascorbate and aldarate metabolism)	17 813
ko00562	磷酸肌醇代谢 (Inositol phosphate metabolism)	15 938
ko00660	C5-支链二元酸代谢 (C5-Branched dibasic acid metabolism)	15 472

天祝藏酒大曲糖酵解/糖异生途径如图 4 所示,其中紫色框代表该酶在宏基因组测序中被注释到,下同;生成丙酮酸的关键酶及基因信息见表 2。由图 4 可知,通路中共有 47 种酶对应的编码基因被注释到。糖酵解/糖异生途径中最主要的一个环节是丙酮酸生成,而丙酮酸也在代谢通路中起到关键的桥梁作用。由表 2 可知,在糖酵解过程中,葡萄糖经一系列酶促反应转化为丙酮酸后,再通过丙酮酸代谢生成乙醛、乙醇、乳酸等物质,同时生成重要的中间产物乙酰辅酶 A。乙酰辅酶 A 既能在酶的催化下生成一系列酯类物质(如乙酸乙酯、乙酸异戊酯等),还能参与 TCA 循环,产生柠檬酸、琥珀酸、延胡索酸等物质,并进一步转化成谷氨酸、脯氨酸、鸟氨酸等氨基酸,而氨基酸也是大曲的主要风味物质^[27]。

乙醛酸和二羧酸代谢途径对大曲风味物质的形成也起着重要作用。乙醛酸循环是其代谢途径中的关键循环,也是其代谢的核心。在这个循环中,乙醛酸既可转化为其他化合物(如乙酰辅酶 A)参与到 TCA 循环中,也可通过转氨酶作用转化为甘氨酸,或通过其他酶的作用转化为其他氨基酸,而这些氨基酸是多种风味物质的前体。在二羧酸代谢途径中,二羧酸可在微生物的代谢活动中发生一系列反应,如通过脱羧反应生成挥发性化合物,这些化合物对大曲的风味有着重要影响。乙醛酸和二羧酸代谢途径能生成多种中间产物,并进一步转化为酯类和醇类物质,进而增加大曲风味的复杂性,提升白酒的香气和口感^[28]。此外,氨基糖和核苷酸糖代谢也对大曲风味物质的形成起着重要作用。在发酵过程中,微生物可将氨基糖转化为具有特定风味的酯类化合物,而核苷酸糖代谢可产生一系列呈味核苷酸(如肌苷酸、鸟苷酸)。

2.3.2 天祝藏酒大曲氨基酸代谢通路分析

氨基酸代谢与大曲曲香的形成密切相关,是风味物质形成的关键途径^[29]。基于 KEGG 数据库,天祝藏酒大曲中共注释到与氨基酸代谢相关的基因 454 303 个。天祝藏酒大曲氨基酸主要代谢通路见表 3。由表 3 可知,代谢程度最旺盛的是甘氨酸、丝氨酸和苏氨酸代谢,共注释到基因 83 822 个。

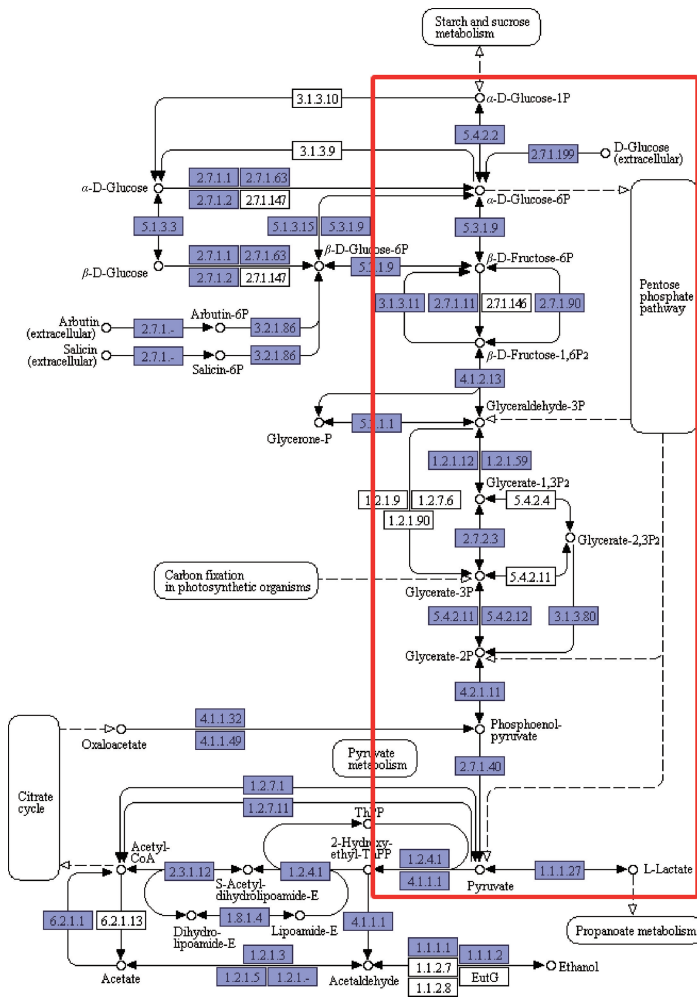


图 4 天祝藏酒大曲糖酵解/糖异生途径

Fig. 4 The glycolysis/gluconeogenesis pathway in Tianzhu Tibetan-flavor Daqu

表 2 天祝藏酒大曲糖酵解/糖异生途径生成丙酮酸的关键酶及基因信息

Table 2 The key enzymes and gene information of pyruvate production by glycolysis/gluconeogenesis in Tianzhu Tibetan-flavor Daqu

KO 号	酶名称	酶编号	基因名称	关键注释微生物(属)
K01835	磷酸葡萄糖变位酶	5. 4. 2. 2	<i>pgm</i>	<i>Virgibacillus</i> , <i>Lichtheimia</i> , <i>Desmospora</i>
K02779	葡萄糖 PTS 系统 EIICB 或 EIICBA 组分	2. 7. 1. 199	<i>ptsG</i>	<i>Oceanobacillus</i>
K01810	葡萄糖-6-磷酸异构酶	5. 3. 1. 9	<i>GPI</i> , <i>pgi</i>	<i>Lichtheimia</i> , <i>Saccharopolyspora</i> , <i>Desmospora</i> , <i>Virgibacillus</i>
K24182	6-磷酸果糖激酶	2. 7. 1. 11	<i>PFK</i>	<i>Lichtheimia</i> , <i>Saccharopolyspora</i> , <i>Lentibacillus</i>
K00895	二磷酸依赖性磷酸果糖激酶	2. 7. 1. 90	<i>pfk</i>	<i>Saccharopolyspora</i> , <i>Oceanobacillus</i>
K01624	果糖-二磷酸醛缩酶	4. 1. 2. 13	<i>FBA</i> , <i>fbaA</i>	<i>Lichtheimia</i> , <i>Saccharopolyspora</i> , <i>Desmospora</i> , <i>Virgibacillus</i>
K00134	3-磷酸甘油醛脱氢酶	1. 2. 1. 12	<i>GAPDH</i> , <i>gapA</i>	<i>Saccharopolyspora</i> , <i>Lichtheimia</i> , <i>Desmospora</i>
K00150	3-磷酸甘油醛脱氢酶	1. 2. 1. 59	<i>gap2</i> , <i>gapB</i>	—
K00927	磷酸甘油酸激酶	2. 7. 2. 3	<i>PGK</i> , <i>pgk</i>	<i>Lichtheimia</i> , <i>Saccharopolyspora</i> , <i>Desmospora</i> , <i>Virgibacillus</i>
K01837	磷酸甘油酸变位酶	5. 4. 2. 11	<i>BPGM</i>	<i>Desmospora</i> , <i>Lentibacillus</i> , <i>Saccharopolyspora</i>
K15633	2,3-双磷酸甘油酸非依赖性磷酸甘油酸变位酶	5. 4. 2. 12	<i>gpmI</i>	<i>Desmospora</i> , <i>Lichtheimia</i> , <i>Saccharopolyspora</i>
K03103	2,3-双磷酸甘油酸 3-磷酸酶	3. 1. 3. 80	<i>MINPP1</i>	<i>Lichtheimia</i>
K01689	烯醇化酶	4. 2. 1. 11	<i>eno</i>	<i>Lichtheimia</i> , <i>Saccharopolyspora</i> , <i>Desmospora</i> , <i>Virgibacillus</i>
K00873	丙酮酸激酶	2. 7. 1. 40	<i>pyk</i>	<i>Desmospora</i> , <i>Lichtheimia</i> , <i>Saccharopolyspora</i>

注：—表示未检测到相关基因所注释到的微生物，下同。

天祝藏酒大曲的甘氨酸、丝氨酸和苏氨酸代谢途径如图 5 所示,关键酶及基因信息见表 4。由图 5

表 3 天祝藏酒大曲氨基酸主要代谢通路
Table 3 The main metabolic pathways of amino acids in Tianzhu Tibetan-flavor Daqu

ko 号	KEGG-途径	基因数目/个
ko00260	甘氨酸、丝氨酸和苏氨酸代谢 (Glycine, serine and threonine metabolism)	83 822
ko00270	半胱氨酸和蛋氨酸代谢 (Cysteine and methionine metabolism)	65 678
ko00280	缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸降解 (Valine, leucine and isoleucine degradation)	61 257
ko00250	丙氨酸、天冬氨酸和谷氨酸代谢 (Alanine, aspartate and glutamate metabolism)	58 470
ko00330	精氨酸和脯氨酸代谢 (Arginine and proline metabolism)	55 095
ko00340	组氨酸代谢 (Histidine metabolism)	44 742
ko00400	苯丙氨酸、酪氨酸和色氨酸生物合成 (Phenylalanine, tyrosine and tryptophan biosynthesis)	43 062
ko00380	色氨酸代谢 (Tryptophan metabolism)	42 084
ko00220	精氨酸生物合成 (Arginine biosynthesis)	38 401
ko00310	赖氨酸降解 (Lysine degradation)	35 981
ko00360	苯丙氨酸代谢 (Phenylalanine metabolism)	33 645
ko00290	缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸的生物合成 (Valine, leucine and isoleucine biosynthesis)	30 531
ko00300	赖氨酸生物合成 (Lysine biosynthesis)	29 136
ko00350	酪氨酸代谢 (Tyrosine metabolism)	21 953

可知,共有 56 种酶对应的编码基因被注释到。丙酮酸和羟基丙酮酸是合成丝氨酸的前体物质。丙酮酸可通过 2 种途径转化为丝氨酸:一是丙酮酸在 L-丝氨酸解氨酶催化下直接转化为丝氨酸;二是丙酮酸经 D-丝氨酸解氨酶催化生成 D-丝氨酸后,再通过丝氨酸消旋酶生成丝氨酸。羟基丙酮酸也可通过 2 种途径转化为丝氨酸:一是羟基丙酮酸直接在丝氨酸乙醛酸转氨酶或丝氨酸丙酮酸转氨酶的催化下转氨生成丝氨酸;二是羟基丙酮酸在甘油酸脱氢酶、羟基丙酮酸还原酶、D-甘油酸-3-激酶等一系列酶的催化下生成磷酸丝氨酸,再经磷酸丝氨酸磷酸酶催化生成丝氨酸。甘氨酸的生成途径有 3 种:一是乙醛酸盐在丙氨酸乙醛酸转氨酶催化下转化为甘氨酸;二是 L-别苏氨酸和 L-2-氨基乙酰乙酸分别在苏氨酸醛缩酶、甘氨酸 C-乙酰转移酶催化下生成甘氨酸;三是肌氨酸在肌氨酸氧化酶或肌氨酸脱氢酶催化下生成甘氨酸。苏氨酸可由天冬氨酸半醛在高丝氨酸脱氢酶、高丝氨酸激酶和苏氨酸合成酶催化下生成。而氨基酸可在不同酶的作用下相互转化,例如,丝氨酸与甘氨酸可在甘氨酸羟甲基转移酶或丝氨酸乙醛酸转氨酶的催化下相互转化;甘氨酸与苏氨酸可在苏氨酸醛缩酶催化下相互转化。

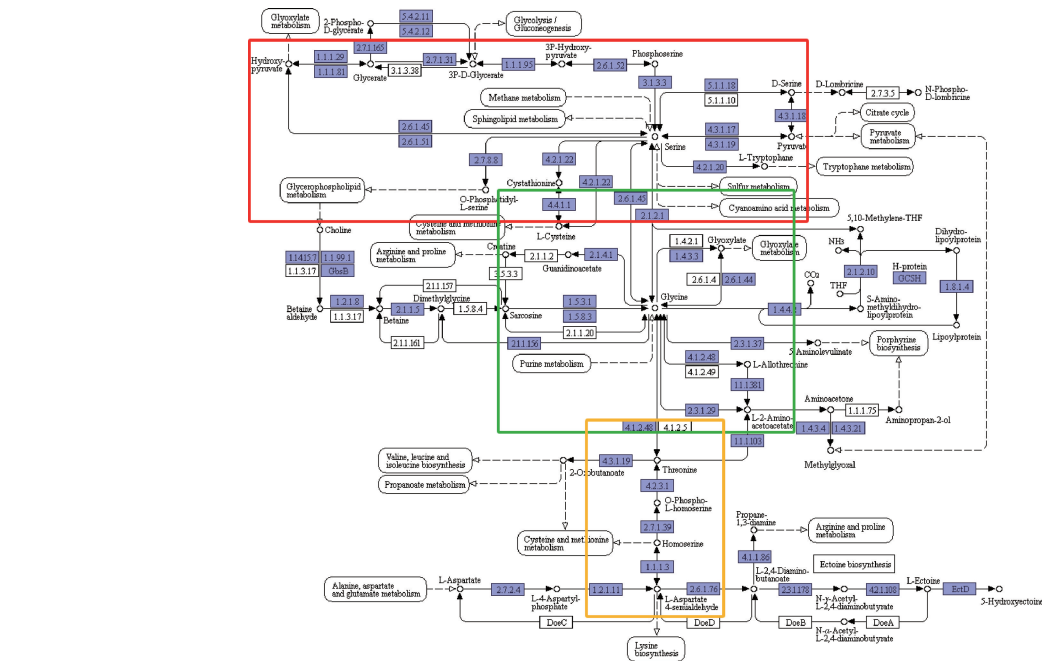


图 5 天祝藏酒大曲的甘氨酸、丝氨酸和苏氨酸代谢途径
Fig. 5 The metabolic pathways of glycine, serine and threonine in Tianzhu Tibetan-flavor Daqu

表 4 天祝藏酒大曲甘氨酸、丝氨酸和苏氨酸代谢途径关键酶及基因信息
Table 4 The key enzymes and gene information of glycine, serine and threonine metabolic pathways in Tianzhu Tibetan-flavor Daqu

KO 号	酶名称	酶编号	基因名称	关键注释微生物(属)
K00018	甘油酸脱氢酶	1. 1. 1. 29	<i>hprA</i>	—
K12972	羟基丙酮酸还原酶	1. 1. 1. 81	<i>ghrA</i>	<i>Lichtheimia</i>
K15918	D-甘油酸-3-激酶	2. 7. 1. 31	<i>GLYK</i>	<i>Lichtheimia</i>
K00058	D-3-磷酸甘油酸脱氢酶	1. 1. 1. 95	<i>serA, PHGDH</i>	<i>Saccharopolyspora, Lichtheimia, Desmospora, Lentibacillus</i>
K00831	磷酸丝氨酸氨基转移酶	2. 6. 1. 52	<i>serC, PSAT1</i>	<i>Lichtheimia, Saccharopolyspora</i>
K01079	磷酸丝氨酸磷酸酶	3. 1. 3. 3	<i>serB, PSPH</i>	<i>Lichtheimia, Saccharopolyspora, Lentibacillus, Desmospora</i>
K12235	丝氨酸消旋酶	5. 1. 1. 18	<i>SRR</i>	<i>Lichtheimia</i>
K20498	D-丝氨酸解氨酶	4. 3. 1. 18	<i>SDS1</i>	<i>Lichtheimia, Virgibacillus</i>
K17989	L-丝氨酸解氨酶	4. 3. 1. 17	<i>SDS, SDH, CHA1</i>	<i>Saccharopolyspora, Lentibacillus, Lichtheimia</i>
K17989	L-丝氨酸解氨酶	4. 3. 1. 19	<i>SDS, SDH, CHA1</i>	<i>Lichtheimia, Saccharopolyspora, Virgibacillus, Lentibacillus, Desmospora</i>
K00830	丝氨酸乙醛酸转氨酶	2. 6. 1. 45	<i>AGXT</i>	<i>Lichtheimia</i>
K00830	丝氨酸丙酮酸转氨酶	2. 6. 1. 51	<i>AGXT</i>	<i>Lichtheimia</i>
K00306	肌氨酸氧化酶	1. 5. 3. 1	<i>PIPOX</i>	<i>Lichtheimia, Saccharopolyspora, Lentibacillu, Virgibacillus</i>
K00314	肌氨酸脱氢酶	1. 5. 8. 3	<i>SARDH</i>	—
K00600	甘氨酸羟甲基转移酶	2. 1. 2. 1	<i>glyA, SHMT</i>	<i>Desmospora, Virgibacillus, Saccharopolyspora, Lichtheimia</i>
K00827	丙氨酸乙醛酸转氨酶	2. 6. 1. 44	<i>AGXT2</i>	<i>Lichtheimia</i>
K01620	苏氨酸醛缩酶	4. 1. 2. 48	<i>ltaE</i>	<i>Lichtheimia, Saccharopolyspora</i>
K00639	甘氨酸 C-乙酰转移酶	2. 3. 1. 29	<i>kbl, GCAT</i>	<i>Lentibacillus</i>
K01733	苏氨酸合成酶	4. 2. 3. 1	<i>thrC</i>	<i>Lichtheimia, Saccharopolyspora, Desmospora</i>
K00872	高丝氨酸激酶	2. 7. 1. 39	<i>thrB</i>	<i>Lichtheimia, Saccharopolyspora, Lentibacillus</i>
K00003	高丝氨酸脱氢酶	1. 1. 1. 3	<i>hom</i>	<i>Saccharopolyspora, Lichtheimia, Desmospora</i>

所有代谢通路可组合形成一个完整的代谢网络,其中,许多代谢产物可在该网络中起到联系不同代谢的纽带作用。例如,在氨基酸代谢中,丙酮酸作为核心枢纽参与多种氨基酸的代谢与转化,这也体现了丙酮酸在整个天祝藏酒大曲代谢途径中的重要地位。

2.4 CAZy 数据库碳水化合物活性酶注释分析

基于 CAZy 数据库,天祝藏酒大曲中共注释到 1 673 160 个基因。这些基因被注释为六大类(见图 6),包括糖基转移酶(Glycosyl Transferases, GT)、糖苷水解酶(Glycoside Hydrolases, GH)、碳水化合物酯酶(Carbohydrate Esterases, CE)、辅助氧化还原酶(Auxiliary Activities, AA)、多糖裂解酶(Polysaccharide Lyases, PL)和碳水化合物结合模块(Carbohydrate-Binding Modules, CBM)。这些酶可组装或降解自然界中广泛存在的碳水化合物(如淀粉、纤维素等)。其中,GT 注释到的基因最多,占总基因数目的 40.49%;其次为 GH 和 CBM,分别占总基因数目的 39.09%和 11.26%。GT 与单

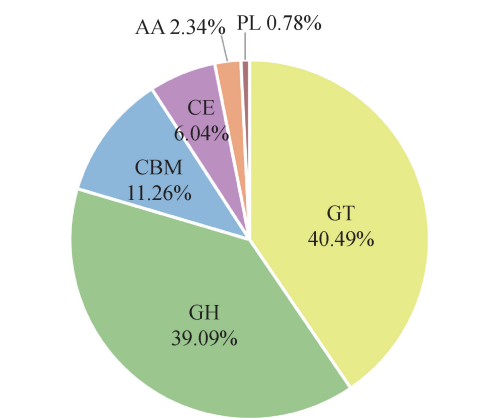


图 6 碳水化合物酶占比
Fig. 6 Proportion diagram of carbohydrate enzyme distribution

糖和多糖的生物合成有关^[30],其较高的占比表明天祝藏酒大曲中可能存在产多糖的微生物。GH 是水解糖苷键的一类重要酶,其中包含与淀粉液化、糖化及纤维素降解相关的酶^[31]。大曲的固态发酵过程是将谷物原料中的糖分转化为微生物能够利用的可发酵糖。因此,GT 注释到的基因数目占比较大。

3 结论

本研究基于宏基因组学技术分析了天祝藏酒大曲的微生物多样性,并挖掘了关键功能基因,得到如下结论:天祝藏酒大曲中,相对丰度大于1.00%的优势菌群在门、属水平上分别有3个、9个,且核心菌群主要来自厚壁菌门和糖多孢菌属。经KEGG数据库注释发现,碳水化合物代谢和氨基酸代谢功能较为突出,其中糖酵解/糖异生及甘氨酸、丝氨酸和苏氨酸代谢最为活跃,即天祝藏酒大曲中的微生物主要在原料降解和风味物质代谢中起着重要作用。经CAZy数据库注释发现,糖苷水解酶和糖基转移酶类数量较多,二者注释到的基因占总基因数目的79.58%。本研究明确了天祝藏酒大曲的微生物组成和主要功能基因,可为改善大曲品质和天祝藏酒工艺提供参考。未来研究将关注大曲中功能性微生物的筛选与鉴定,通过强化功能微生物的代谢活性来增强白酒的风味特性,从而提升白酒的品质和口感。

参考文献:

[1] ZHANG J,LIU S P,SUN H L,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.

[2] CHEN Y R,LI K M,LIU T,et al. Analysis of difference in microbial community and physicochemical indices between surface and central parts of Chinese special-flavor Baijiu Daqu[J]. Frontiers in Microbiology,2021,11:592421.

[3] 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.

[4] 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.

[5] ZHENG X W,YAN Z,NOUT M J,et al. Characterization of the microbial community in different types of Daqu samples as revealed by 16S rRNA and 26S rRNA gene clone libraries [J]. World Journal of Microbiology & Biotechnology,2015,31(1):199-208.

[6] 罗爱国,杨牛恬,郑同庆,等. 清香型白酒酿酒大曲微生物菌群多样性解析[J]. 中国酿造,2022,41(4):73-79.

[7] 夏亚男,刘皓,双全. 基于宏基因组分析酸马奶的微生物多样性及功能基因[J]. 中国食品学报,2022,22(2):301-309.

[8] 夏亚男,双全. 基于宏基因组技术分析固态发酵枣酒酒醅的微生物多样性及关键风味基因[J]. 食品科学,2022,43(2):192-198.

[9] 蔡世胜,麻建功. 甘肃诞生藏香型白酒其酿造工艺获国家发明专利[J]. 中国酒,2013(7):74-75.

[10] 周海龙,贾志龙,乔海军,等. 藏香型系列白酒特征风味化合物分析[J]. 食品与发酵工业,2024,50(20):326-334.

[11] 张红,张卫兵,乔海军,等. 天祝传统藏曲中蛋白酶产生菌的筛选与酶学特性研究[J]. 食品与发酵科技,2022,58(4):8-13.

[12] WANG Y R,CAI W C,WANG W P,et al. Analysis of microbial diversity and functional differences in different types of high-temperature Daqu [J]. Food Science & Nutrition,2020,9(2):1003-1016.

[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):209-218.

[14] 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.

[15] WANG X D, QIU S Y, LI P, et al. Analysis of microbial community structure in traditional and automated Moutai-flavor Daqu [J]. Journal of the American Society of Brewing Chemists,2019,77(2):140-146.

[16] HU Y N, HUANG X N, YANG B, et al. Contrasting the microbial community and metabolic profile of three types of light-flavor Daqu[J]. Food Bioscience,2021,44:101395.

[17] 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.

[18] LIU S P,ZHANG Z F,MAO J Q,et al. Integrated metagenomics approaches reveal *Saccharopolyspora* as the core functional genus in Huangjiu fermentations [J]. NPJ Biofilms and Microbiomes,2023,9(1):65.

[19] HANAN A E, EHAB A B, GEHAN M A E, et al. *Achromobacter* sp. and *Virgibacillus pantothenicus* as models of thermo-tolerant lipase-producing marine bacteria from North Delta sediments (Egypt) [J]. African Journal of Microbiology Research,2015,9(14):1001-1011.

[20] ZHU Q, CHEN L Q, PENG Z, et al. The differences in carbohydrate utilization ability between six rounds of Sauce-flavor Daqu [J]. Food Research International,2023,163:112184.

[21] ZHANG W L,FANG D,ZHANG T,et al. Characterization of a metal-dependent D-psicose 3-epimerase from a novel strain, *Desmospora* sp. 8437 [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry,2013,61(47):11468-11476.

[22] FU G M, DENG M F, CHEN Y, et al. Analysis of microbial community,physiochemical indices,and volatile compounds of Chinese te-flavor Baijiu Daqu produced in different seasons[J]. Journal of the Science of Food and Agriculture,2021,101(15):6525-6532.

[23] WU X Y,JIANG Q E,WANG Z S,et al. Diversity,enzyme production and antibacterial activity of *Bacillus* strains isolated from sesame-flavored liquor Daqu[J]. Archives of Microbiology,2021,203(9):5831-5839.

[24] XU Y, WANG D, FAN W L, et al. Traditional Chinese biotechnology[M]//TSAO G T,OUYANG P,CHEN J,et al. Advances in biochemical engineering/biotechnology. Berlin, Heidelberg:Springer Berlin Heidelberg,2009:189-233.

[25] 周会娴,熊琴琴,刘志勇,等. 中高温大曲发酵中小麦籽粒营养组分的动态变化分析[J]. 食品与发酵工业, 2024,50(15):48-55.

[26] 赵平,刘庆静,杨光,等. 红茶菌发酵液宏基因组分析[J]. 安徽农业科学,2024,52(9):71-78,106.

[27] 张金萍,于佳俊,贾福晨,等. 基于宏基因组学分析西藏青稞酒发酵过程中微生物多样性与风味形成的关系[J]. 食品与发酵工业,2025,51(5):310-321.

[28] ZHU C T, CHENG Y X, SHI Q L, et al. Metagenomic analyses reveal microbial communities and functional differences between Daqu from seven provinces[J]. Food Research International,2023,172:113076.

[29] VAN BOEKEL M A J S. Formation of flavour compounds in the Maillard reaction [J]. Biotechnology Advances, 2006,24(2):230-233.

[30] KIM J H, AN H J, GARRIDO D, et al. Proteomic analysis of *Bifidobacterium longum* subsp. infantis reveals the metabolic insight on consumption of prebiotics and host glycans[J]. PLoS One,2013,8(2):e57535.

[31] GRAEBIN N G, SCHÖFFER J D, DEANDRADES D, et al. Immobilization of glycoside hydrolase families GH1, GH13, and GH70: State of the art and perspectives[J]. Molecules,2016,21(8):1074.

Analysis of microbial community diversity and function of Tianzhu

Tibetan-flavor Daqu based on metagenomic technology

LI Yaping¹, QIAO Haijun², JIA Zhilong², WANG Yue¹, ZHANG Zhongming¹,

LIU Qi¹, WEN Delin³, ZHANG Weibing¹

1. College of Food Science and Engineering, Gansu Agricultural University, Lanzhou 730070, China;

2. College of Science, Gansu Agricultural University, Lanzhou 730070, China;

3. Gansu Tianzhu Tibetan-flavor Liquor Co., Ltd., Wuwei 733200, China

Abstract:To deeply explore the characteristics of Tianzhu Tibetan-flavor Daqu and its role in the Baijiu brewing process, the diversity of microbial communities was analyzed by using metagenomic technology, and its functional genes were annotated. The results showed that the microorganisms identified from Tianzhu Tibetan-flavor Daqu belonged to 53 phyla and 835 genera, of which the dominant phyla included Firmicutes, Actinobacteria and Mucoromycota, and the dominant genera included *Saccharopolyspora*, *Virgibacillus*, *Lentibacillus*, *Lichtheimia*, *Desmospora*, *Oceanobacillus*, *Bacillus*, *Synecephalastrum* and *Streptomyces*. A total of 22 metabolic pathways were annotated at the secondary level of KEGG database, among which carbohydrate metabolism and amino acid metabolism were the most prominent. Moreover, glycolysis/gluconeogenesis and glycine, serine and threonine metabolism were the most vigorous. Glycosyl transferase and glycoside hydrolase annotated the most genes by the CAZy database, accounting for 40.49% and 39.09% of the total number of genes, respectively.

Key words:Tianzhu Tibetan-flavor Daqu;metagenomic technology;microbial community;diversity;functional gene

[责任编辑:杨晓娟]