

复合香型白酒粮醅机械化和传统堆积发酵过程中微生物群落结构的对比分析

程伟^{1,2}, 陈雪峰^{1,3,*}, 陈兴杰², 周端^{1,3}, 李娜², 潘天全², 薛锡佳²

(1. 陕西科技大学食品科学与工程学院, 陕西 西安 710021;

2. 安徽金种子酒业股份有限公司, 安徽 阜阳 236023; 3. 陕西农产品加工技术研究院, 陕西 西安 710021)

摘要:以复合香型白酒机械化和传统堆积发酵的粮醅为对象, 采用高通量测序技术对堆积发酵过程中粮醅的微生物群落结构进行对比分析。结果表明, 粮醅堆积过程中存在酿酒微生物的交换、演替和富集, 不同堆积方式下的粮醅微生物可归为*Bacillus*、*Weissella*、*Acetobacter*和*Ralstonia* 4个主要细菌属, 归为*Aspergillus*、*Lichtheimia*、*Candida*、*Pichia*、*Wickerhamomyces*和*Saccharomyces* 6个主要真菌属。机械化堆积方式下, 细菌属的多样性明显高于传统堆积, 真菌属的多样性明显低于传统堆积; 同时, 粮醅表层的细菌多样性低于粮醅内部, 而粮醅表层的真菌多样性高于粮醅内部。该研究有利于揭示粮醅机械化堆积的微生物群落结构组成及其差异, 为持续优化复合香型白酒的机械化酿造工艺及原酒品质提升提供依据。

关键词: 粮醅; 堆积发酵; 高通量测序; 多样性; 机械化

Comparative Analysis of Microbial Community between Mechanized and Traditional Stack Fermentation of Fermented Grains for Fuhexiangxing Baijiu

CHENG Wei^{1,2}, CHEN Xuefeng^{1,3,*}, CHEN Xingjie², ZHOU Duan^{1,3}, LI Na², PAN Tianquan², XUE Xijia²

(1. School of Food Science and Engineering, Shaanxi University of Science & Technology, Xi'an 710021, China;

2. Jinzhongzi Distillery Co. Ltd., Fuyang 236023, China;

3. Shaanxi Research Institute of Agricultural Product Processing Technology, Xi'an 710021, China)

Abstract: High-throughput sequencing technology was used to analyze the microbial community of fermented grains for Fuhexiangxing baijiu during mechanized and traditional stack fermentation. The results showed that microbial exchange, succession and enrichment occurred during the fermentation process. In both fermented grains, the microbial communities were composed of four major bacterial genera including *Bacillus*, *Weissella*, *Acetobacter* and *Ralstonia*, and six major fungal genera including *Aspergillus*, *Lichtheimia*, *Candida*, *Pichia*, *Wickerhamomyces* and *Saccharomyces*. The diversity of bacteria was significantly higher in mechanized than traditional stack fermentation, while the diversity of fungi was significantly lower in traditional than mechanized stack fermentation. Moreover, bacterial diversity was lower on the surface than in the interior of fermented grains, whereas fungal diversity was higher on the surface than in the interior of fermented grains. These results provide a basis for continuous optimization of the mechanized brewing process of Fuhexiangxing baijiu and for improving the quality of base baijiu.

Keywords: fermented grains; stack fermentation; high-throughput sequencing; diversity; mechanization

DOI:10.7506/spkx1002-6630-20220815-178

中图分类号: TS261.1; TS262.3

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630 (2023) 14-0152-10

引文格式:

程伟, 陈雪峰, 陈兴杰, 等. 复合香型白酒粮醅机械化和传统堆积发酵过程中微生物群落结构的对比分析[J]. 食品科学, 2023, 44(14): 152-161. DOI:10.7506/spkx1002-6630-20220815-178. <http://www.spkx.net.cn>

收稿日期: 2022-08-15

基金项目: 2019年度安徽省科技重大专项计划项目(201903a06020054);

2021年度安徽省“皖北产业创新团队”支持计划项目(FK2021-WB06)

第一作者简介: 程伟(1984—)(ORCID: 0000-0003-4580-6377), 男, 高级工程师, 博士研究生, 研究方向为发酵工程与酿酒生产技术。E-mail: 564853735@qq.com

*通信作者简介: 陈雪峰(1964—)(ORCID: 0000-0003-0997-9262), 男, 教授, 博士, 研究方向为发酵工程。

E-mail: chenxf@sust.edu.cn

CHENG Wei, CHEN Xuefeng, CHEN Xingjie, et al. Comparative analysis of microbial community between mechanized and traditional stack fermentation of fermented grains for Fuhexiangxing baijiu[J]. Food Science, 2023, 44(14): 152-161. (in Chinese with English abstract) DOI:10.7506/spkx1002-6630-20220815-178. <http://www.spkx.net.cn>

粮醅的高温堆积是酱香、芝麻香等香型白酒重要的酿造工艺,堆积过程可网罗和富集酿造环境中的微生物,并形成独特且丰富的微生物菌群,进而产生多种酶类和风味及其前体物质。高温堆积过程可通过美拉德反应或微生物代谢形成并积累特殊香气成分,进而形成酒体的“酱香、芝麻香”等香气特征^[1]。粮醅堆积发酵过程中富集的各类微生物对白酒酿造均具有重要作用;其中,细菌产生的蛋白酶可分解蛋白质及淀粉,为美拉德反应提供前体物质,对酒体“焦香”的形成具有重要作用^[2];酵母菌主要产乙醇、酯类及其他多种风味物质;霉菌可产生糖化酶、液化酶等酶类,有利于原料的利用和特殊产香微生物的生长^[3]。对粮醅堆积发酵过程中微生物群落结构的研究有利于明确固态发酵过程中特殊产香微生物的菌群来源,对优化粮醅堆积发酵工艺具有重要意义。传统白酒酿造的机械化是白酒行业的发展趋势,对白酒传统和机械化酿造在微生物多样性、风味差异等方面的解析,有助于实现白酒机械化酿造的稳定优质生产。

近年来,采用高通量测序技术对粮醅堆积发酵过程中的微生物群落结构进行了较多研究^[4-5]。如张瀚之等^[6]采用高通量测序及其数理分析对酱香型白酒机械化酿造7个轮次堆积发酵酒醅的真菌菌群结构进行分析,结果表明*Thermomyces*、*Thermoascus*、*Aspergillus*、*Torulaspota*、*Byssoschlamys*、*Candida*和*Wickerhamomyces*是酱香型白酒机械化堆积过程中重要的真菌属。复合香等香型白酒的酿造也普遍采用粮醅堆积发酵工艺^[7];然而,关于复合香型白酒粮醅堆积发酵过程中微生物群落结构的研究还鲜有报道,尤其是关于粮醅机械化和传统堆积发酵过程中微生物群落结构特征的比较研究较少。本研究以复合香型白酒机械化和传统堆积发酵过程中的粮醅为样品,采用高通量测序技术对微生物群落结构进行分析,全面解析机械化堆积发酵过程中粮醅微生物群落结构和主导菌群的变化特征,有利于揭示粮醅机械化堆积的微生物群落结构组成及差异,旨在为持续优化复合香型白酒的机械化酿造工艺及原酒品质提升提供依据。

1 材料与amp;方法

1.1 材料与试剂

粮醅样品:分别取自安徽金种子酒业股份有限公司的机械化和传统酿酒车间,在粮醅堆积过程中的0(堆

积开始)、12、24 h和48 h(堆积结束)分为表层和内部分别取样,同时检测不同取样点的温度并取平均值;其中,机械化堆积的表层样品命名为AS1、AS2、AS3和AS4,内部样品命名为AI1、AI2、AI3和AI4;传统堆积的表层样品命名为TS1、TS2、TS3和TS4,内部样品命名为TI1、TI2、TI3和TI4。

环境及工艺条件:于2022年5月中旬进行并取样,酿酒厂区的环境温度在18~30℃左右,环境湿度在50%~60%左右。在用粮和用曲的质量、种类和比例以及配糟和蒸煮等工艺条件均基本相同的情况下,粮醅在机械化车间进行配料、蒸煮、摊凉并加曲后,再分别进行机械化堆积(机械化酿酒车间)和传统堆积(转运到传统酿酒车间),其堆积时间均为48 h。

氯化钠、磷酸二氢钠、磷酸氢二钠(均为分析纯)天津市永大化学试剂有限公司;饱和酚、十二烷基硫酸钠(sodium dodecyl sulfate, SDS)、乙二胺四乙酸(ethylenediamine tetraacetic acid, EDTA)-Na₂、十六烷基三甲基溴化铵(cetrimonium bromide, CTAB)(均为分析纯)北京索莱宝科技有限公司;三羟甲基氨基甲烷(Tris)(分析纯)美国Sigma-Aldrich公司;AxyPrep DNA凝胶回收试剂盒 美国Qiagen公司。

1.2 仪器与设备

TGL-20M高速冷冻离心机、超低温冰箱 上海卢湘仪离心机仪器有限公司;MX.S型可调式混匀仪 美国SCIOLOGEX公司;GeneAmp[®]9700型聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR)仪 美国ABI公司;QuantiFluor型-ST蓝色荧光定量系统 美国Promega公司。

1.3 方法

1.3.1 样品采集

在粮醅堆表层(3~5 cm)和内部(80~100 cm)的5个不同位置分别取样后混合,并随机取3个平行样本,再平均分别分为两份;其中1份在无菌环境下将3个平行样品分别单独等量混合后,保存于无菌袋中,置于-80℃冰箱备微生物群落结构分析;另1份将3个平行样品分别保存于普通样品袋中,置于4℃冰箱备理化指标检测。

如图1所示,机械化堆积明显区别于传统堆积,机械化堆积的粮醅置于堆积床内相对密闭的空间,粮醅与车间环境的接触较少(堆积高度100 cm,宽度120 cm,长度660 cm);传统堆积将粮醅置于车间空旷的场地内进行堆积(堆积高度150 cm,底部四周宽度280 cm,顶部四周宽度120 cm)。

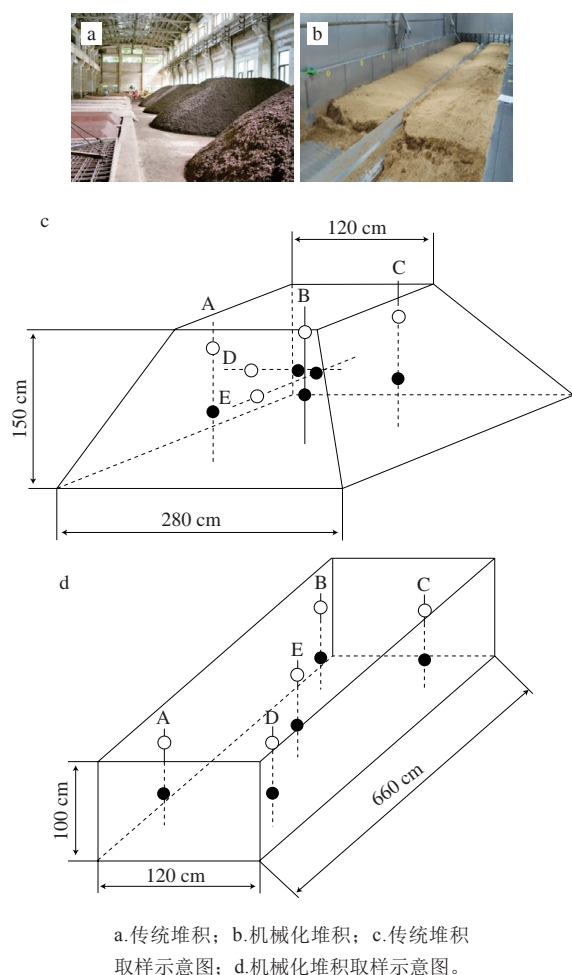


图1 粮醅不同堆积方式的外观及取样点示意图

Fig. 1 Pictures of traditional and mechanized stack fermentation and schematic diagrams of sampling points

1.3.2 DNA提取

粮醅微生物总DNA提取的前处理方法与参考文献[4,8],参考土壤DNA提取试剂盒(E.Z.N.A. Soil DNA Kit)操作说明书进行粮醅总DNA的提取。利用琼脂糖凝胶电泳检测DNA的纯度和浓度,最后向离心管中加入200 μ L无菌双蒸水使DNA沉淀溶解,并贮于 -20°C 备用。

1.3.3 PCR扩增

PCR扩增定量:以稀释后的基因组DNA为模板,根据测序区域的选择,使用带Barcode的特异引物(Phusion[®] High-Fidelity PCR Master Mix with GC Buffer: New England Biolabs)和高效高保真酶进行PCR,确保扩增效率和准确性。细菌多样性鉴定:正向引物515F (GTGYCAGCMGCCGCGGTAA)和反向引物806R (GGACTACN VGGGTWTCTAAT)扩增16S V3~V4 (b)序列结构域。真菌多样性鉴定:正向引物ITS5-1737F (GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG)和反向引物ITS2-2043R (GCTGCGTTCTTCATCGATGC)扩增ITS1 (a)序列区域。

PCR条件:将样品均匀稀释至20 ng/ μ L,当样品不足时直接使用原溶液;同时,根据样品的实际情况进行稀释调整;扩增体系(25 μ L):5 \times reaction buffer 5 μ L, 5 \times GC buffer 5 μ L, dNTP (2.5 mmol/L) 2 μ L, Forward primer (10 μ mol/L) 1 μ L, Reverse primer (10 μ mol/L) 1 μ L, DNA Template 2 μ L, ddH₂O 8.75 μ L, Q5 DNA聚合酶0.25 μ L;放大参数:98 $^{\circ}\text{C}$ 初始变性2 min, 98 $^{\circ}\text{C}$ 变性15 s, 55 $^{\circ}\text{C}$ 滚转30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 最终延伸5 min, 10 $^{\circ}\text{C}$ 保持25~30个循环。

PCR产物的纯化和混样:PCR产物使用2%琼脂糖凝胶进行电泳检测,对检测合格的PCR产物进行磁珠纯化;采用酶标定量,根据PCR产物浓度进行等量混样,充分混匀后使用2%琼脂糖凝胶电泳检测PCR产物,对目的条带使用胶回收试剂盒回收产物。

1.3.4 文库构建和上机测试

使用TruSeq[®] DNA PCR-Free Sample Preparation Kit建库试剂盒进行文库构建,构建好的文库经过Qubit和Q-PCR定量,文库合格后使用NovaSeq6000进行上机测序。建库与测序在上海派森诺生物科技股份有限公司完成。

1.3.5 理化指标的测定

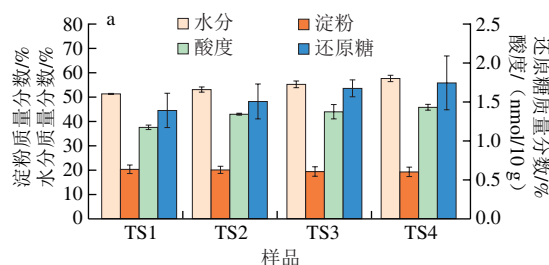
粮醅的水分测定采用烘干法,酸度测定采用酸碱滴定法,淀粉和还原糖的测定采用斐林试剂法,具体参照DB 34/T 2264—2014《固态发酵酒醅分析方法》。

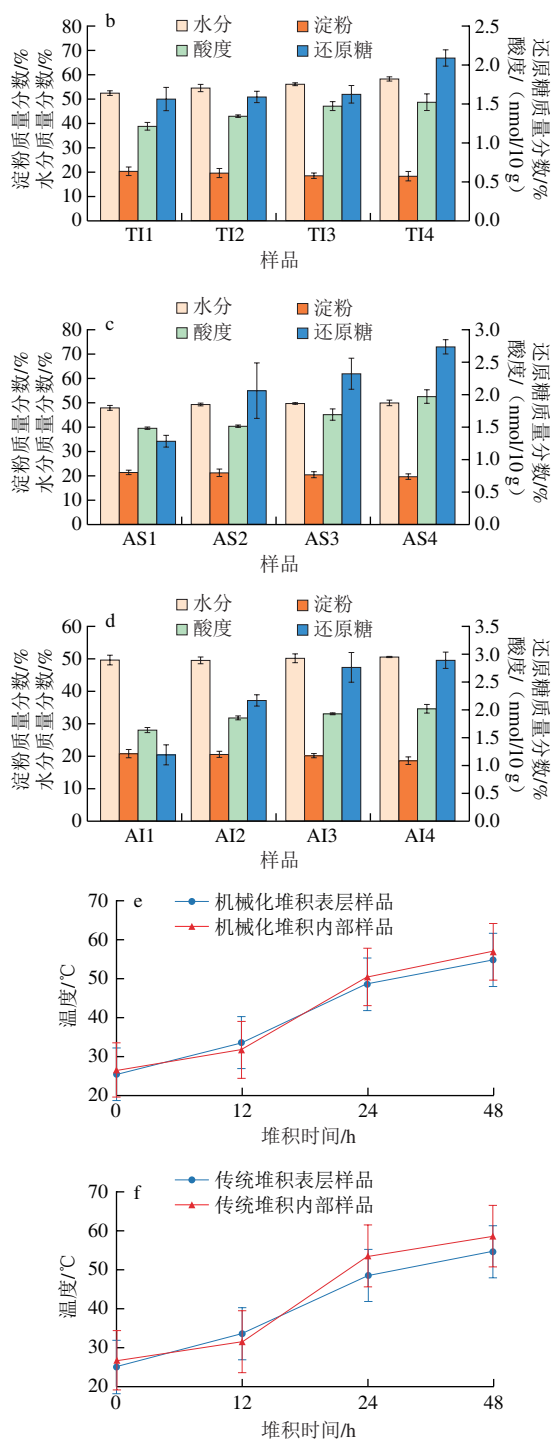
1.4 数据处理及绘图

高通量测序完成后进行数据分析与序列优化,将序列相似性大于等于97%分归为同一分类操作单元(operational taxonomic unit, OTU),将所有序列与Silva (SILVA_138.1)库比对,得到序列的分类学信息。基于Illumina MiSeq测序平台中的R语言绘制群落组成图和Heatmap图。通过计算微生物之间的Spearman相关系数,再选取 $|\rho|>0.8$ 且 $P<0.05$ 的作为互作对象,然后使用Cytoscape 3.4.0 (<http://www.cytoscape.org>)对微生物与微生物之间的相互关系进行可视化关联网络分析,以表征微生物与微生物之间的共现性关系。

2 结果与分析

2.1 粮醅堆积发酵过程中的理化指标及温度变化分析





a.传统堆积表层粮醅理化指标变化; b.传统堆积内部粮醅理化指标变化; c.机械化堆积表层粮醅理化指标变化; d.机械化堆积内部粮醅理化指标变化; e.机械化堆积粮醅温度变化; f.传统堆积粮醅温度变化。

图2 粮醅堆积发酵过程中的理化指标及温度变化

Fig. 2 Changes in physicochemical indexes and temperature in fermented grains during fermentation

对不同堆积方式而言,开始堆积时粮醅表层和内部的理化指标及温度基本相同。如图2所示,不同堆积方式下,堆积过程中粮醅的水分、酸度和还原糖均有平

缓增加的趋势,淀粉含量有减小的趋势;其中,机械化堆积过程中,水分含量的增加较为平缓,酸度的增加明显高于传统堆积,这可能与机械化密闭式的堆积环境明显区别于传统开放式的堆积环境有关。机械化堆积方式下,粮醅堆积48 h后表层的水分、酸度、淀粉和还原糖分别为50.12%、1.97 nmol/10 g、19.62%、2.74%,堆积内部的水分、酸度、淀粉和还原糖分别为50.58%、2.02 nmol/10 g、18.53%、2.89%,这可能是由于堆积过程中粮醅表层和内部环境条件、微生物菌群等因素的不同所导致。

粮醅酸度主要来源于产酸菌的有机酸代谢,有机酸在防止杂菌污染的同时,可作为白酒的主要风味物质及生成酯类物质的前体物质^[9]。粮醅理化参数在影响微生物群落演替的同时也受到微生物代谢的影响。粮醅的淀粉含量变化能有效反映出原料淀粉是否利用及粮醅是否进行初步发酵。还原糖由淀粉酶、糖化酶等分解淀粉而生成,是微生物发酵的主要能量来源,堆积粮醅中还原糖的含量变化在一定程度上可以反映堆积发酵情况。综上所述,不同堆积方式下,粮醅中淀粉均得到一定程度的利用,同时粮醅的堆积有利于为固态发酵提供有机酸、还原糖等物质基础。

不同堆积方式下,粮醅表层和内部的温度均有不同程度的升高(图2e、f),其中粮醅堆积48 h后内部的温度均高于表层。机械化堆积方式下,粮醅堆积48 h后表层和内部的温度分别为54.8 °C和56.9 °C,明显低于传统堆积方式的56.3 °C和58.6 °C,这可能与机械化堆积粮醅的高度低于传统堆积等因素有关。研究表明,粮醅堆积过程的高温是功能微生物代谢活动旺盛的表现,更是堆积过程中微生态结构调整的推动力^[10]。另外,传统堆积的表面积大于机械化堆积,粮醅与车间环境接触较多,并受环境温度、湿度和通风等因素的影响较大,因此粮醅表层各局部整体上接触(接种)环境微生物的面积也较大。

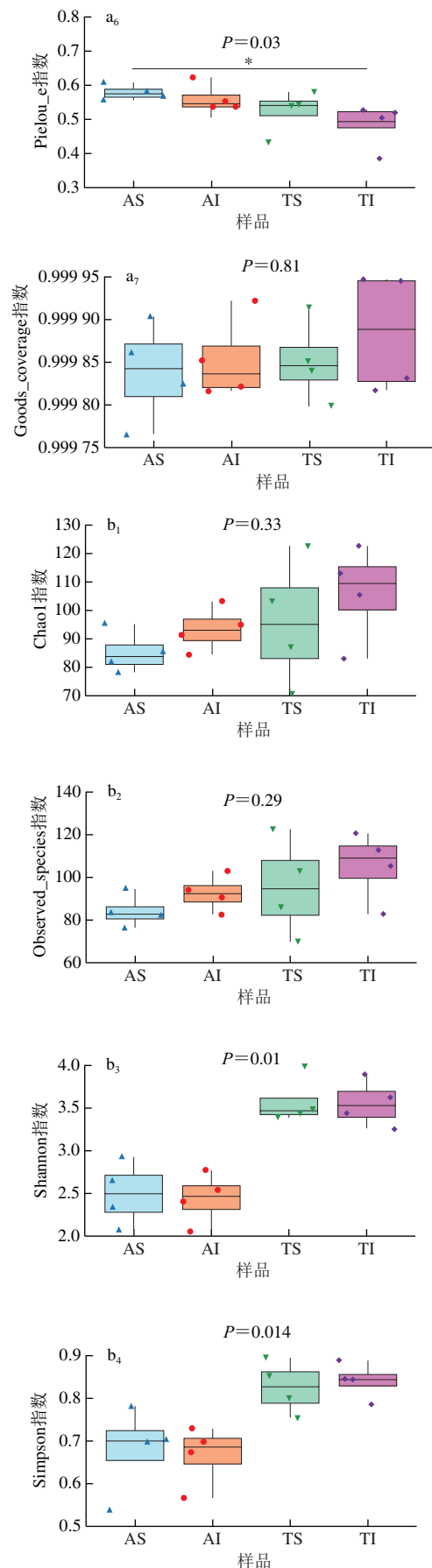
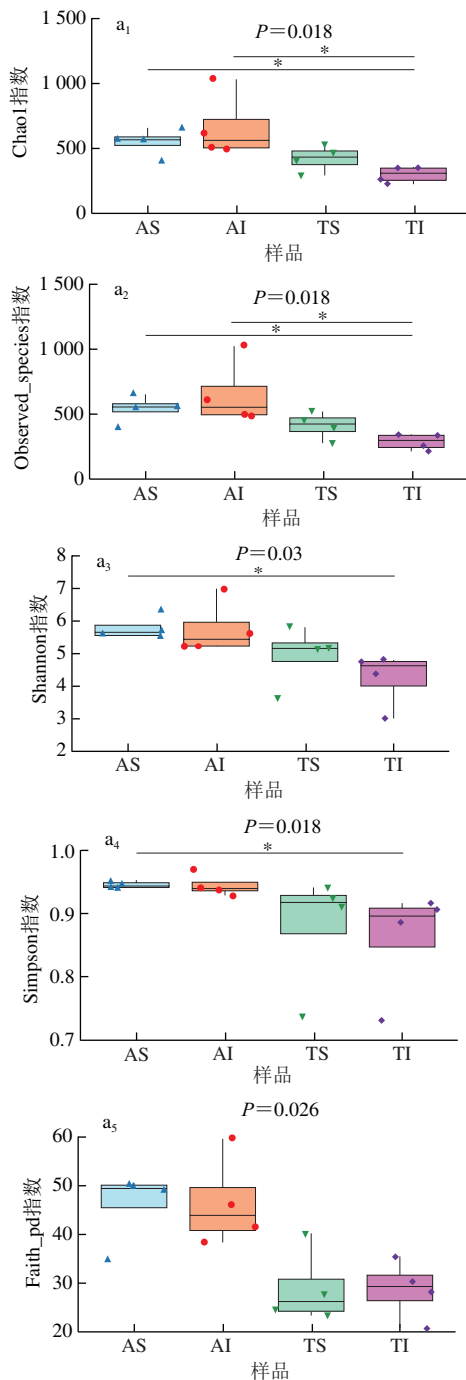
2.2 粮醅堆积发酵过程中的微生物群落结构分析

2.2.1 序列统计、有效性及 α 多样性分析

对各样品的DNA进行测序,测序序列经质控过滤后分别得到95 111~121 170条细菌的有效序列,其平均长度为101~374 bp,聚类分析共产生7 620个OTU分类;测序序列经质控过滤后分别得到58 636~96 930条真菌的有效序列,其平均长度为17~438 bp,聚类分析共产生1 504个OTU分类。 α 多样性分析可以反映微生物群落的丰度和多样性^[11],由图3 α 多样性指数可知,各组样品的覆盖率均大于0.999,Chao1指数的P值分别为0.018和0.33。综上所述,本次测序各样品文库的覆盖率较高,样品序列基本被完全测出,各样品的测序结果较可靠。

覆盖率在99%的OTU水平进行Chao1指数计算以估计物种数目(即OTU数目)。由图3a可知,AI组的Chao1

指数高于其他样品组,表明AI组的细菌物种总数高于其他样品组;同样,由图3b可知, TI组的Chao1指数高于其他样品组,表明TI组的真菌物种总数高于其他样品组。Shannon指数和Simpson指数均能表现出样品中物种的多少、均匀度及多样性^[12]。由图3a可知, AI组的Shannon指数和Simpson指数均高于其他样品组,表明AI组细菌物种的均匀度及多样性高于其他样品组;同样,由图3b可知, TI组的Shannon指数和Simpson指数均高于其他样品组,表明TI组的真菌物种的均匀度及多样性高于其他样品组。



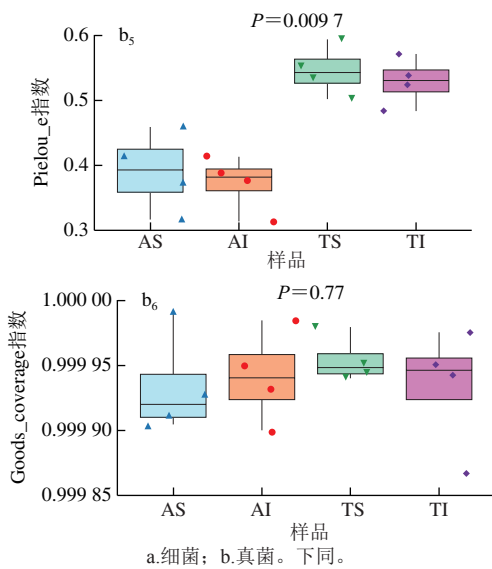


图3 不同堆积方式下粮醅微生物的α多样性分析
Fig. 3 Analysis of microbial α-diversity in fermented grains

对不同堆积方式而言,由图3a可知,AS组和AI组的Shannon指数和Simpson指数均分别高于TS组和TI组;由图3b可知,AS组和AI组的Shannon指数和Simpson指数均低于TS组和TI组;综上所述,机械化堆积方式下,粮醅的细菌多样性明显高于传统堆积,而粮醅的真菌多样性明显低于传统堆积。另外,由图3a可知,AS组的Shannon指数和Simpson指数均低于AI组;由图3b可知,AS组的Shannon指数和Simpson指数均高于AI组;综上所述,机械化堆积方式下,粮醅表层的细菌多样性低于粮醅内部,而粮醅表层的真菌多样性高于粮醅内部。

2.2.2 OTU分布的Venn分析

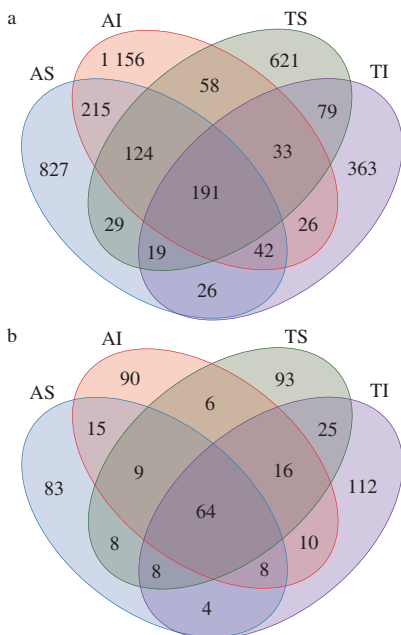


图4 不同堆积方式下粮醅微生物OTU分布的Venn分析
Fig. 4 Venn analysis of microbial OTUs in fermented grains between mechanized and traditional stack fermentation

对不同堆积方式下粮醅微生物的OTU进行分类统计,并对不同样品组之间相对共有及独有的OTU数进行叠加,有利于直观地比较OTU数目组成,并可以推测样品组中的微生物多样性及丰度^[13]。由图4a可知,不同样品组的共有细菌OTU为191个,占样品组总OTU的6.00%;其中,AI组的特有OTU数最大为1156个,占样品组总OTU的36.30%,表明AI组的细菌多样性最高。另外,AS组的细菌OTU数低于AI组,表明机械化堆积方式下,粮醅表层的细菌多样性低于粮醅内部,这与Shannon指数和Simpson指数的分析结果一致。由图4b可知,不同样品组的共有真菌OTU为64个,占样品组总OTU的14.48%;其中, TI组的特有OTU数最大为112个,占样品组总OTU的25.34%,表明TI组的真菌多样性最高。

2.2.3 基于门水平的微生物群落结构分析

将各类OTU的代表序列与Unite的数据库比对,得到每个OTU在不同分类水平的物种分类信息。高通量测序显示所有粮醅中的细菌种群可归属于21个门,如图5a所示,不同堆积方式下粮醅微生物可归为Firmicutes、Proteobacteria、Actinobacteria、Bacteroidetes 4个主要细菌门,其相对丰度均大于1.00%;其中, Firmicutes和Proteobacteria的相对丰度均大于22.00%,是堆积粮醅中的优势细菌门。不同堆积方式下,粮醅表层和内部的微生物基于门水平的细菌群落结构分布差异并不明显,同样以上述4个细菌门为主。

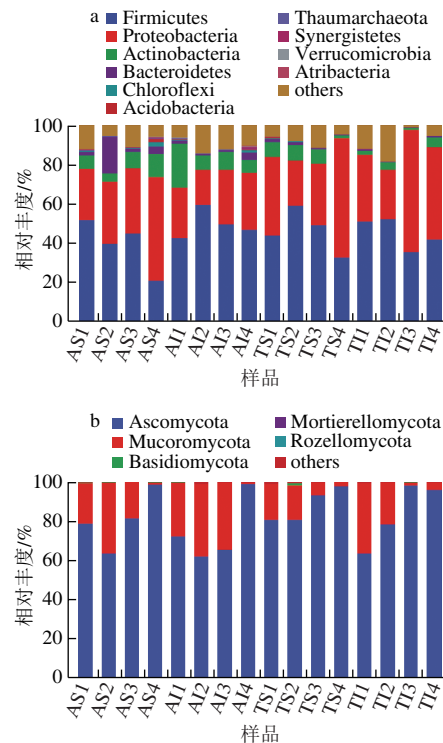


图5 不同堆积方式下粮醅微生物基于门水平的群落结构分布图
Fig. 5 Microbial community structure at the phylum level in fermented grains

高通量测序显示所有粮醅中的真菌种群可归属于10个门,如图5b所示,不同堆积方式下粮醅微生物可归为Ascomycota和Mucoromycota 2个主要真菌门,其相对丰度均大于1.00%;其中,Ascomycota为绝对优势真菌门,其在不同样品中的相对丰度均大于60.00%。另外,堆积结束后粮醅中Ascomycota的相对丰度均大于95.00%(AS4、AI4、TS4和TI4)。研究表明,Ascomycota是酱香^[14]、清香^[15]、浓香^[16]等香型白酒酒醅中的主要真菌门,该菌门是白酒发酵过程中的关键真菌门。不同堆积方式下,粮醅表层和内部基于门水平的真菌群落结构分布有所差异,尤其是堆积结束后粮醅的真菌群落结构明显差异于堆积前。

2.2.4 基于属水平的微生物群落结构分析

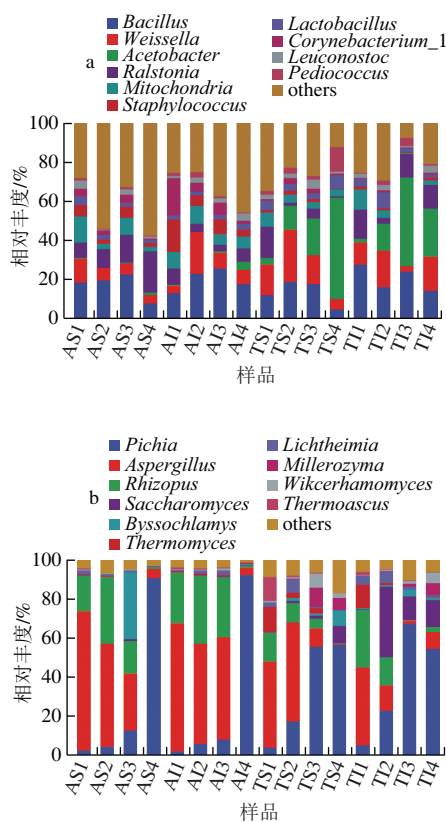


图6 不同堆积方式下粮醅微生物基于属水平的群落结构分布图

Fig. 6 Microbial community structure at the genus level in fermented grains

如图6a所示,不同堆积方式下粮醅微生物可归为*Bacillus*、*Weissella*、*Acetobacter*和*Ralstonia* 4个主要细菌属,其相对丰度均大于1.00%。其中,*Bacillus*具有较强的分泌蛋白酶、淀粉酶和纤维素酶能力,具有耐高温、产酶、产香的功能,其主要代谢产物包括吡嗪类、酮类、丙酸、1,3-丁二醇、乙酸、甲酯等风味物质^[17]。*Weissella*在白酒发酵过程中可代谢产生乳酸、乙酸等有机酸类物质,*Acetobacter*在白酒发酵过程中能将乙醇转

化为乙酸,酸类物质是白酒中重要的风味物质及酯类合成的前体物质。不同堆积方式下,堆积结束后粮醅内部*Bacillus*相对丰度明显高于粮醅表层,这可能与粮醅堆内部温度高于表层有关。与机械化堆积方式相比,传统堆积粮醅*Acetobacter*相对丰度明显较高;同时,传统堆积粮醅表层*Acetobacter*相对丰度明显高于内部,这可能与粮醅表层的温度低于内部有关。

如图6b所示,不同堆积方式下粮醅微生物可归为*Aspergillus*、*Lichtheimia*、*Candida*、*Pichia*、*Wickerhamomyces*、*Saccharomyces* 6个主要真菌属,其相对丰度均大于1.00%;同时,随着堆积时间延长,*Pichia*和*Saccharomyces*相对丰度逐渐增高。机械化堆积过程中*Aspergillus*的相对丰度逐渐降低,*Pichia*相对丰度逐渐增高;同样,传统堆积也表现出相似的规律。堆积结束后粮醅中*Pichia*相对丰度均大于54.00%(AS4、AI4、TS4和TI4),其在粮醅表层和内部的相对丰度差异不明显。机械化堆积方式下,堆积结束后粮醅表层和内部*Pichia*相对丰度均大于90.00%(AS4、AI4),明显高于传统堆积。传统堆积方式下,堆积结束后粮醅表层和内部*Wickerhamomyces*相对丰度均大于2.00%(TS4、TI4)并明显高于机械化堆积,*Saccharomyces*相对丰度均明显高于机械化堆积。研究表明,*Wickerhamomyces*和*Pichia*在酿酒中主要起到产香的作用,同时具有产酒代谢能力,*Saccharomyces*是酒醅中主要的产酒酵母^[18]。

2.3 基于物种分类属水平的微生物群落演替Heatmap分析

粮醅堆积过程中大曲、粮醅和环境微生物相互影响,不同堆积深度的温度、空气、粮醅营养状况等均存在差异;同时,机械化堆积环境相对封闭,导致不同堆积时间或深度的优势菌群存在差异。如图7所示属水平上丰度前20的微生物群落Heatmap图,颜色越接近绿色表示该菌属的相对丰度越高,颜色越接近棕色表示该菌属的相对丰度越低。

由图7a可知,机械化堆积方式下,AS1、AS2、AS3、AS4区域中相对丰度大于1.00%的微生物分别对应9、12、12、13种。不同堆积方式下,不同堆积时间的粮醅中没有共有的优势细菌属,其中至少有2个区域相对丰度均较高的细菌属,包括*Lactobacillus*、*Sphingomonas*、*Acinetobacter*、*Rhodococcus*和*Pseudomonas*。*Bacillus*在AS1、AS2、AS3、AS4区域中的相对丰度均较高,分别为18.1%、19.46%、22.59%、7.47%;同样,*Bacillus*在TS1、TS2、TS3、TS4区域中的相对丰度也较高,分别为11.87%、18.51%、17.45%、4.69%。综上所述,由于细菌类群的耐受性、适应性更强,对粮醅表面而言,机械化堆积方式下*Bacillus*的相对丰度均高于传统堆积;对粮醅内部而言,*Bacillus*、*Weissella*、*Ralstonia* 3个细菌属在AI4的相对丰度均大于TI4。

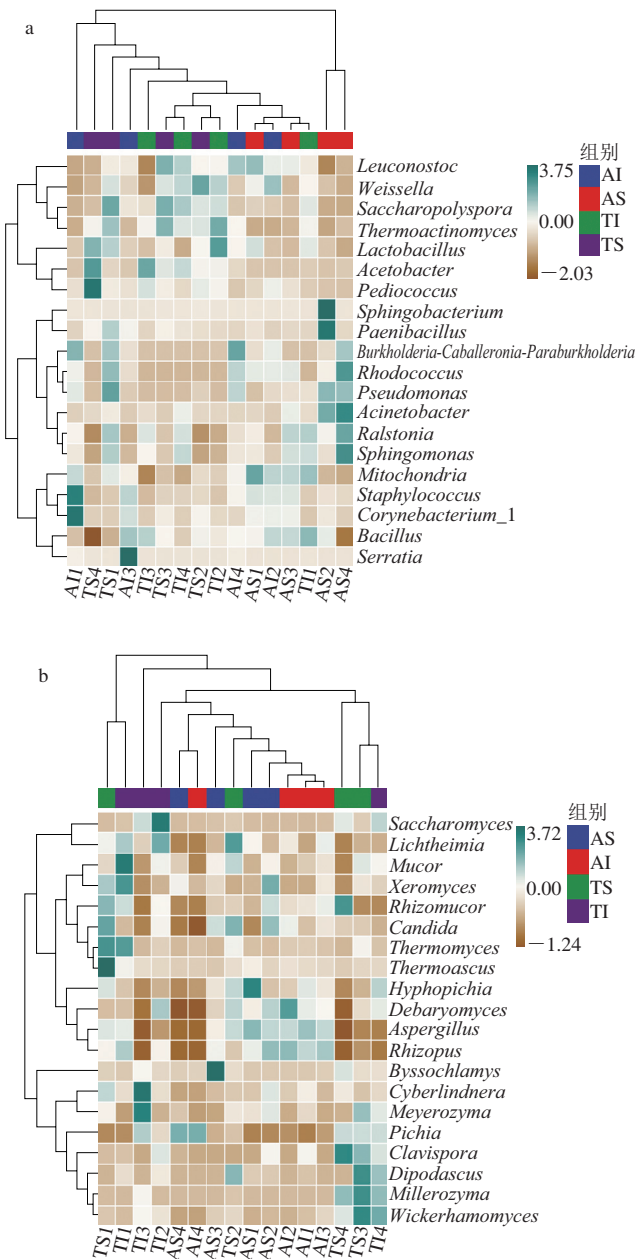


图7 不同堆积方式下粮醅微生物基于属水平的Heatmap图
Fig. 7 Heatmap of microbial community at the genus level in fermented grains

由图7b可知，机械化堆积方式下，AS1、AS2、AS3、AS4区域中相对丰度大于1.00%的微生物分别对应5、4、5、3种。不同堆积方式下，不同堆积时间的粮醅中没有共有的优势真菌属，其中至少有2个区域相对丰度均较高的真菌属有*Pichia*、*Aspergillus*、*Rhizopus*、*Lichtheimia*和*Candida*。在TS1、TS2、TS3、TS4区域中分别对应9、8、10、6种相对丰度大于1.00%的真菌属，其中至少有2个区域相对丰度均较高的真菌属有*Pichia*、*Aspergillus*、*Rhizopus*、*Saccharomyces*、*Byssoschlamys*、*Thermomyces*、*Lichtheimia*、

Millerozyma、*Wickerhamomyces*、*Candida*和*Rhizomucor*，上述真菌属是复合香型粮醅机械化堆积过程中的重要真菌属。其中，*Aspergillus*能产生多种酶类，对大曲和酒醅的糖化力、酯化力、液化力等起到积极的调控作用；同时，该菌属可通过代谢有机酸和脂肪酸，以促成芳香酯类物质的生成，有利于提升和改善酒体风味^[19-20]。

对粮醅内部而言，*Pichia*、*Byssoschlamys*在AI4的相对丰度明显大于TI4；同时，*Saccharomyces*、*Hyphopichia*、*Millerozyma*、*Dipodascus*、*Wickerhamomyces* 5个真菌属在AI4的相对丰度均低于TI4。研究表明，*Wickerhamomyces*是重要的生香酵母，其具有耐高酸度和产酯能力强的特点，发酵粮醅中该菌属主要来源于大曲的添加^[6]。多种酵母菌属能在酯酶的作用下合成酯类及其他风味物质，从而赋予酒体浓郁的芳香，对酒体的丰满也具有重要作用，该菌属是影响白酒风味和质量的重要因素^[21]。综上表明，堆积过程中存在酿酒微生物的交换、演替和富集，具有网络环境中酵母菌的作用，同时还可能直接产生丰富的呈香呈味物质及其前体物质。有研究表明，在堆积发酵过程中控制适宜的微生物种类和数量对出酒率和原酒质量都具有重要影响^[22]；同时，稳定有效地调控粮醅堆积过程，有利于为入窖发酵提供合适的微生物及代谢产物基础；因此，粮醅微生物的富集情况、相互作用及环境因素影响还需要深入研究。

2.4 基于物种分类属水平的微生物关联网络分析

关联网络分析主要用于寻找特定微生物群落时空变化或环境过程驱动下所呈现的共现或互斥的固有模式，进而分析环境差异或实验处理所导致的群落物种装配差异，并寻找撬动群落组成变化的关键菌群或物种^[23]。如图8所示，其中节点代表样本中的扩增子序列变异或OTU，节点大小与其丰度成正比，选择按物种组成比例注释节点；节点间连线表示被连接的两个节点之间存在相关性，红色线条表示不同物种之间存在负相关，绿色线条表示不同物种之间存在正相关。

在白酒固态发酵过程中，核心及关键微生物菌群的结构组成及其功能决定了白酒的风格及品质^[14,24]。由图8a可知，*Bacillus*、*Lactobacillus*、*Staphylococcus*等细菌属与其他细菌属的正相关性比较密切，属于堆积粮醅中的核心细菌菌群；同时，*Bacillus*和*Lactobacillus*之间存在明显的负相关。由图8b可知，*Aspergillus*、*Pichia*、*Lichtheimia*等真菌属与其他真菌属的正相关性比较密切，属于堆积粮醅中的核心真菌菌群；同时，*Lichtheimia*和*Saccharomyces*之间以及*Pichia*和*Saccharomyces*、*Thermomyces*之间均存在明显的正相关。综上所述，上述6个菌属所组成的核心微生物菌群是粮醅堆积发酵过程中的关键菌群。

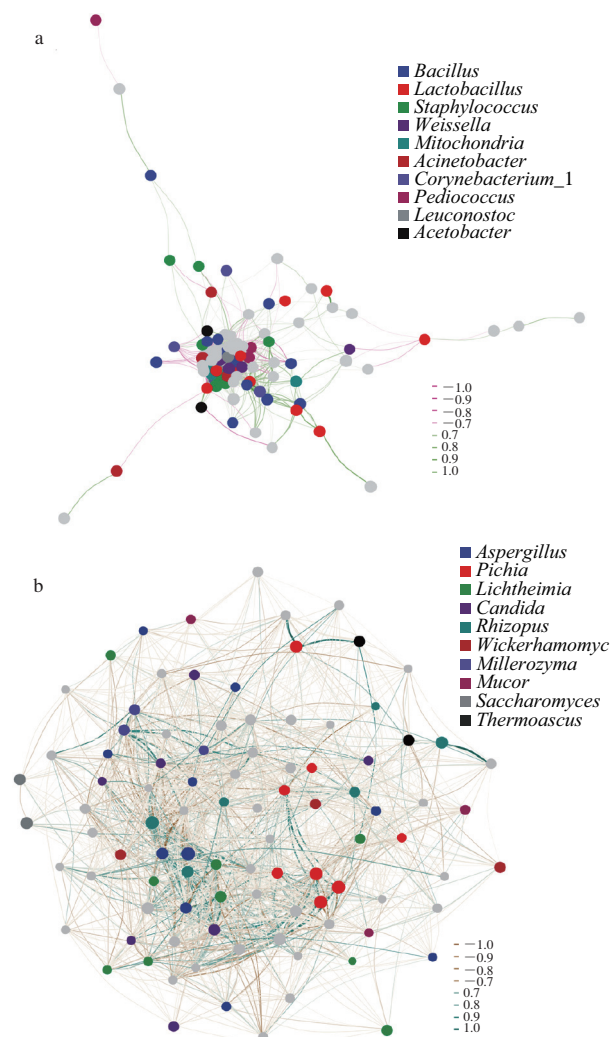


图8 不同堆积方式下粮醅微生物基于属水平的共现性关联网络图
Fig. 8 Cooccurrence network diagram of microbial communities at the genus level in fermented grains

机械化堆积方式对环境因子的影响以及微生物的相互作用,导致了真菌类群在种类和相对丰度上的差异,如*Pichia*、*Aspergillus*等真菌属得以富集;同样,对细菌类群也存在一定影响,如*Bacillus*、*Weissella*等细菌属得以富集。粮醅堆积发酵过程中的*Pichia*主要来源于酿造环境,其具有较好的热耐受性及较强的竞争效应^[25]。研究表明,酸度、还原糖和温度是酿造过程中细菌群落变化的决定因素,在真菌群落演替过程中酿酒酵母占据主导地位^[26]。传统堆积方式下,粮醅堆积过程中微生物得以不断驯化和富集,如*Acetobacter*等细菌属,*Saccharomyces*、*Byssoschlamys*、*Wickerhamomyces*等真菌属,其中的*Saccharomyces*与主要醇类、酯类和醛类的含量密切相关^[27]。由于稻壳、大曲、粮食(堆积粮醅)等的不断补充和循环发酵,导致白酒发酵体系内外存在微生物的交换、演替和富集,并且空气流动、配糟发酵、物料交换等因素也导致不同酿造环节之间的微生物相互

影响^[7]。粮醅堆积过程中形成了独特的微生物菌群结构,富集的微生物菌群代谢产生丰富的发酵酶类和风味物质,对酒体风味的形成具有重要作用^[28-29]。

3 结论与讨论

本研究通过高通量测序技术解析粮醅机械化和传统堆积发酵过程中的微生物群落结构变化,得到的结论主要有:1)不同堆积方式下的粮醅微生物可归为*Bacillus*、*Weissella*、*Acetobacter*和*Ralstonia*4个主要细菌属,*Aspergillus*、*Lichtheimia*、*Candida*、*Pichia*、*Wickerhamomyces*和*Saccharomyces*6个主要真菌属;2)机械化堆积方式下,细菌属的多样性明显高于传统堆积,真菌属的多样性明显低于传统堆积;同时,粮醅表层的细菌多样性低于粮醅内部,而粮醅表层的真菌多样性高于粮醅内部;3)不同堆积方式下,不同堆积时间的优势微生物类群存在差异,堆积过程中存在酿酒微生物的交换、演替和富集;4)*Bacillus*、*Lactobacillus*、*Staphylococcus*细菌属,以及*Aspergillus*、*Pichia*、*Lichtheimia*真菌属,上述6个菌属所组成的核心微生物菌群是粮醅堆积发酵过程中的关键菌群。

粮醅堆积发酵过程中的内源性理化因子,如乙醇、水分、酸度以及温度等因素都会由于发酵过程中的微生物代谢方式或活性的改变而发生改变,进而影响微生物的群落组成^[30]。由于粮醅堆积表层和内部存在空气、温度及湿度等条件的差异,同时粮醅堆积表面积不同导致粮醅与环境微生物的交换情况也存在差异,均有可能导致不同堆积方式下粮醅表层和内部微生物种类及丰度的差异。机械化车间和传统车间在使用年限、车间环境等方面的不同导致环境微生物存在差异^[31],同时粮醅堆积过程中差异性地网罗了环境中的功能优势菌属^[32],也是导致堆积粮醅微生物结构差异的重要原因。环境微生物是发酵菌群的重要来源,在驱动白酒发酵微生物的演替和代谢过程中具有重要作用^[33]。本研究有利于揭示粮醅机械化堆积的微生物群落结构组成及差异,为持续优化复合香型白酒的机械化酿造工艺提供依据。由于机械化堆积和传统堆积在工艺和环境等方面的差异,导致粮醅微生物多样性及优势微生物菌群的筛选、富集也有所差异。本研究中发现的粮醅差异微生物菌属,对酿造环境的应答特性、迁移规律以及对白酒酿造的影响最终会影响原酒感官品质,因此还需后续进一步深入分析和跟踪研究。

参考文献:

- [1] ZHANG W Q, LI J L, RAO Z M, et al. Sesame flavour baijiu: a review[J]. Journal of the Institute of Brewing, 2020, 126: 224-232. DOI:10.1002/jib.614.

- [2] YAO S, LIU Y, LI H, et al. Bacterial communities during the process of high temperature *daqu* production of roasted sesame-like flavour liquor[J]. Journal of the Institute of Brewing, 2015, 121: 440-448. DOI:10.1002/jib.235.
- [3] YOU L, ZHAO D, ZHOU R Q, et al. Distribution and function of dominant yeast species in the fermentation of strong-flavor baijiu[J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2021, 37(2): 1-12. DOI:10.1007/s11274-020-02988-y.
- [4] 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-Food Science and Technology, 2021, 143: 111119. DOI:10.1016/j.lwt.2021.111119.
- [5] LI Z J, FAN Y, HUANG X N, et al. Microbial diversity and metabolites dynamic of light-flavor baijiu with stacking process[J]. Fermentation, 2022, 8(2): 67. DOI:10.3390/fermentation8020067.
- [6] 张瀚之, 席德州, 王欢, 等. 酱香型白酒机械化酿造不同轮次堆积发酵酒醅真菌群落结构多样性研究[J]. 中国酿造, 2021, 40(12): 64-69. DOI:10.11882/j.issn.0254-5071.2021.12.012.
- [7] 程伟, 陈雪峰, 陈兴杰, 等. 全二维气相色谱-飞行时间质谱法分析麴合香白酒中挥发性特征组分[J]. 食品与发酵工业, 2022, 48(11): 239-245. DOI:10.13995/j.cnki.11-1802/ts.029119.
- [8] 王欢, 席德州, 黄永光, 等. 酱香型白酒机械化酿造不同轮次堆积发酵细菌群落结构多样性分析[J]. 食品科学, 2020, 41(2): 188-195. DOI:10.7506/spkx1002-6630-20181218-202.
- [9] LI P, LIN W F, LIU X, et al. Environmental factors affecting microbiota dynamics during traditional solid-state fermentation of Chinese *Daqu* starter[J]. Frontiers in Microbiology, 2016, 7: 1237. DOI:10.3389/fmicb.2016.01237.
- [10] 曹润洁, 何宏魁, 葛向阳, 等. 芝麻香型酒醅堆积过程中微生物结构变化分析[J]. 微生物学通报, 2019, 46(6): 1371-1380. DOI:10.13344/j.microbiol.china.180482.
- [11] SCHLOSS P D, GEVERS D, WESTCOTT S L. Reducing the effects of PCR amplification and sequencing artifacts on 16S rRNA-based studies[J]. PLoS ONE, 2011, 6(12): e27310. DOI:10.1371/journal.pone.0027310.
- [12] WANG Z, SU Z X, YANG Q, et al. Characterizing relationship of microbial community in *Xiaoqu* and volatiles of light-aroma-type *Xiaoqu* Baijiu[J]. Food Science and Technology Research, 2020, 26(6): 749-758. DOI:10.3136/istr.26.749.
- [13] THOMAS S B, SCHMIDT F, MATIAS R, et al. Limits to robustness and reproducibility in the demarcation of operational taxonomic units[J]. Environmental Microbiology, 2015, 17(5): 1689-1706. DOI:10.1111/1462-2920.12610.
- [14] 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. DOI:10.3389/fmicb.2017.01294.
- [15] LI X R, MA E B, YAN L Z, et al. Bacterial and fungal diversity in the traditional Chinese liquor fermentation process[J]. International Journal of Food Microbiology, 2011, 146(1): 31-37. DOI:10.1016/j.ijfoodmicro.2011.01.030.
- [16] ZHANG W X, QIAO Z W, TANG Y Q, et al. Analysis of the fungal community in zaopei during the production of Chinese Luzhou-flavour liquor[J]. Journal of the Institute of Brewing, 2012, 113(1): 21-27. DOI:10.1002/j.2050-0416.2007.tb00251.x.
- [17] 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. DOI:10.1007/s13213-014-0809-z.
- [18] 曹润洁, 周鹏磊, 何宏魁, 等. 堆积酒醅中酵母菌代谢的分析研究[J]. 酿酒科技, 2021, 329(11): 57-60. DOI:1001-9286(2021)11-0057-04.
- [19] 黄永光. 酱香型白酒酿造中 *Aspergillus hennebergii* 及其分泌酸性蛋白酶的研究[D]. 无锡: 江南大学, 2014.
- [20] DORN-IN S, HÖLZEL C S, JANKE T, et al. PCR-SSCP-based reconstruction of the original fungal flora of heat-processed meat products[J]. International Journal of Food Microbiology, 2013, 162(1): 71-81. DOI:10.1016/j.ijfoodmicro.2012.12.022.
- [21] TU W Y, CAO X N, CHENG J, et al. Chinese baijiu: the perfect works of microorganisms[J]. Frontiers in Microbiology, 2022, 13: 919044. DOI:10.3389/fmicb.2022.919044.
- [22] 李小东, 高大禹, 田庆贞, 等. 芝麻香型白酒堆积发酵对入窖发酵过程及原酒品质的影响[J]. 食品与发酵工业, 2018, 44(5): 63-69. DOI:10.13995/j.cnki.11-1802/ts.016483.
- [23] 王鹏, 吴群, 徐岩. 中国白酒发酵过程中的核心微生物群及其与环境因子的关系[J]. 微生物学报, 2018, 58(1): 142-153. DOI:10.13344/j.cnki.wxsb.20170060.
- [24] WANG S L, WU Q, NIE Y, et al. Construction of synthetic microbiota for reproducible flavor compound metabolism in Chinese light-aroma-type liquor produced by solid-state fermentation[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2019, 85(10): e03090-18. DOI:10.1128/AEM.03090-18.
- [25] ZHANG H X, WANG L, TAN Y W, et al. Effect of *Pichia* on shaping the fermentation microbial community of sauce-flavor Baijiu[J]. International Journal of Food Microbiology, 2020, 336: 108898. DOI:10.1016/j.ijfoodmicro.2020.108898.
- [26] SHEN D J, SHEN H Y, YANG Q, et al. Deciphering succession and assembly patterns of microbial communities in a two-stage solid-state fermentation system[J]. Microbiology Spectrum, 2021, 9(2): e00718-21. DOI:10.1128/Spectrum.00718-21.
- [27] LIN B, TANG J, YANG Q, et al. Microbial succession and its effect on key aroma components during light-aroma-type *Xiaoqu* Baijiu brewing process[J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2022, 38(10): 1-14. DOI:10.1007/s11274-022-03353-x.
- [28] WANG L, LIU X F, YANG F, et al. Microbiome analysis and random forest algorithm-aided identification of the diacetyl-producing microorganisms in the stacking fermentation stage of Maotai-flavor liquor production[J]. Food Biotechnology, 2019, 33(4): 338-352. DOI: 10.1080/08905436.2019.1673770.
- [29] 王琳, 胡小霞, 黄永光. 茅台镇酱香型白酒不同生产轮次酿造环境的细菌群落结构特征[J]. 食品科学, 2021, 42(22): 185-192. DOI:10.7506/spkx1002-6630-20200708-113.
- [30] 赵亮, 闵卓, 吴福勇, 等. 酱香型酒醅堆积发酵过程中优势菌群和稀有菌群对细菌总群落演替模式的影响[J]. 食品科学, 2022, 43(2): 168-175. DOI:10.7506/spkx1002-6630-20210107-071.
- [31] LI Y L, LIU S P, ZHANG S Y, et al. Spatiotemporal distribution of environmental microbiota in spontaneous fermentation workshop: the case of Chinese Baijiu[J]. Food Research International, 2022, 156: 111126. DOI:10.1016/j.foodres.2022.111126.
- [32] 左乾程, 黄永光, 朱家合, 等. 清酱香型白酒冬季发酵细菌群落演替及堆积过程细菌来源解析[J]. 食品科学, 2021, 42(12): 145-152. DOI:10.7506/spkx1002-6630-20200420-251.
- [33] WANG X S, DU H, XU Y. Environmental microbiota drives microbial succession and metabolic profiles during Chinese liquor fermentation[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2018, 84(4): e02369-17. DOI:10.1128/AEM.02369-17.