

浓香型白酒酒醅发酵过程中微生物群落结构演替及其与理化指标相关性

曾波¹, 饶家权², 邹永芳², 文静², 黄治国^{1,3}, 邓杰^{1,3,*}

(1.四川轻化工大学 酿酒生物技术及应用四川省重点实验室, 四川 宜宾 644000; 2.舍得酒业股份有限公司, 四川 射洪 629000; 3.中国轻工业酿酒生物技术及智能制造重点实验室, 四川 宜宾 644000)

摘要: 为明确浓香型白酒酒醅中微生物群落结构的演替规律及其潜在功能, 通过高通量测序技术解析酒醅微生物群落在发酵过程中的动态变化, 分析不同发酵节点的微生物群落与理化指标的相关性, 并采用PICRUSt分析对酒醅中微生物群落的功能进行预测。结果表明: 厚壁菌门(Firmicutes)、变形菌门(Proteobacteria)、放线菌门(Actinobacteriota)、子囊菌门(Ascomycota)、担子菌门(Basidiomycota)是酒醅中的优势菌门, 浓香型酒醅中微生物以乳杆菌属(*Lactobacillus*)、芽孢杆菌属(*Bacillus*)、葡萄球菌属(*Staphylococcus*)、高温放线菌属(*Thermoactinomyces*)、哈萨克斯坦酵母属(*Kazachstania*)、威克汉姆酵母属(*Wickerhamomyces*)、青霉菌属(*Penicillium*)、假丝酵母菌属(*Candida*)、曲霉属(*Aspergillus*)、季也蒙酵母属(*Meyerozyma*)和德巴利酵母属(*Debaryomyces*)为主, *Lactobacillus*、*Kazachstania*、*Wickerhamomyces*占绝对优势; 相关性分析表明, 还原糖、淀粉含量与8个细菌属呈显著正相关($P<0.05$), 酸度、水分含量与10个细菌属呈显著负相关($P<0.05$), 部分真菌与理化指标显著相关; PICRUSt分析表明, 不同发酵节点的功能酶相对丰度差异显著, 酒醅中的优势微生物参与糖酵解、酸代谢、乙醇合成形成完整的代谢链, 说明酒醅微生物群落的演替是不同发酵节点代谢差异的主要原因。本研究分析了酒醅微生物的演替规律及其在发酵过程中参与的代谢, 为白酒酿造微生物的代谢机制研究提供一定理论基础。

关键词: 浓香型白酒; 酒醅; 微生物群落; 相关性分析

Structural Succession of Microbial Communities in Fermented Grains for Nongxiangxing Baijiu during the Fermentation Process and Its Correlation with Physicochemical Indicators

ZENG Bo¹, RAO Jiaquan², ZOU Yongfang², WEN Jing², HUANG Zhiguo^{1,3}, DENG Jie^{1,3,*}

(1. Liquor Brewing Biotechnology and Application Key Laboratory of Sichuan Province, Sichuan University of Science & Engineering, Yibin 644000, China; 2. Shede Spirits Co. Ltd., Shehong 629000, China; 3. Liquor Brewing Biotechnology and Intelligent Manufacturing Key Laboratory of China Light Industry, Yibin 644000, China)

Abstract: In order to clarify the succession pattern and potential functions of the microbial communities in fermented grains for Nongxiangxing baijiu, high-throughput sequencing was used to investigate the dynamic change of microbial community structure, and the correlations between microbial community structure and physicochemical indicators were analyzed at different fermentation stages. Phylogenetic Investigation of Communities by Reconstruction of Unobserved States (PICRUSt) was used to predict the potential functions of microbial communities in fermented grains. The results showed that Firmicutes, Proteobacteria, Actinobacteriota, Ascomycota, and Basidiomycota were the dominant phyla in fermented grains. The dominant genera were *Lactobacillus*, *Bacillus*, *Staphylococcus*, *Thermoactinomyces*, *Kazachstania*, *Wickerhamomyces*, *Penicillium*, *Candida*, *Aspergillus*, *Meyerozyma*, *Debaryomyces*, with *Lactobacillus*, *Kazachstania* and *Wickerhamomyces* being the absolutely dominant ones. The contents of reducing sugar and starch showed a significantly positive correlation

收稿日期: 2023-08-04

基金项目: 中国生态酿酒产业技术研究院项目(SD-ST-007); 四川省科技创新创业苗子工程项目(23MZGC0042); 四川轻化工大学研究生创新基金项目(Y2022095)

第一作者简介: 曾波(1998—)(ORCID: 0000-0001-5183-1697), 男, 硕士研究生, 研究方向为酿酒生物技术及应用。

E-mail: 1044326125@qq.com

*通信作者简介: 邓杰(1988—)(ORCID: 0000-0003-3525-0950), 男, 实验师, 博士研究生, 研究方向为酿酒生物技术及应用。E-mail: 380553839@qq.com

with 8 bacterial genera ($P < 0.05$). Acidity and moisture content showed a significantly negative correlation with 10 bacterial genera. Some fungi were significantly correlated with physicochemical indicators. PICRUSt analysis showed that the relative abundance of functional enzymes was significantly different at different fermentation stages, and the dominant microorganisms in fermented grains participated in glycolysis, acid metabolism and ethanol synthesis to form a complete metabolic chain, indicating that the microbial community succession of fermented grains could be the major reason for the differences in metabolism at different fermentation stages. The findings of this study would provide a theoretical basis for the study of the metabolic mechanisms of microorganisms used for baijiu brewing.

Keywords: Nongxiangxing baijiu; fermented grains; microbial community; correlation analysis

DOI:10.7506/spkx1002-6630-20230804-030

中图分类号: TS261.1

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630 (2024) 07-0111-08

引文格式:

曾波, 饶家权, 邹永芳, 等. 浓香型白酒酒醅发酵过程中微生物群落结构演替及其与理化指标相关性[J]. 食品科学, 2024, 45(7): 111-118. DOI:10.7506/spkx1002-6630-20230804-030. <https://www.spkx.net.cn>

ZENG Bo, RAO Jiaquan, ZOU Yongfang, et al. Structural succession of microbial communities in fermented grains for Nongxiangxing baijiu during the fermentation process and its correlation with physicochemical indicators[J]. Food Science, 2024, 45(7): 111-118. (in Chinese with English abstract) DOI:10.7506/spkx1002-6630-20230804-030. <https://www.spkx.net.cn>

浓香型白酒是中国白酒的典型代表, 具有窖香浓郁、绵甜醇厚、香味协调、回味悠长等特征, 深受消费者青睐, 其产量和销量比例占整个白酒行业的70%^[1]。酒醅是浓香型白酒生产的重要微生物来源之一, 包括酵母、霉菌、细菌在内的多种微生物对生产原料中大分子有机物分解能力较强, 其代谢产物也可以作为白酒呈香物质的前体物, 对白酒生产过程中香味物质的形成起关键作用^[2]。因此, 对白酒酒醅中微生物群落结构的研究成为近几年白酒领域的研究热点。

由于浓香型白酒发酵过程中窖内环境的变化, 酒醅微生物呈动态、有规律的演变^[3]。肖辰等^[4]通过对浓香型酒醅细菌群落结构的演替规律研究发现, 酒醅中乳杆菌属 (*Lactobacillus*) 在发酵初期迅速增长, 发酵中后期相对丰度呈缓慢上升趋势, 是酒醅中的绝对优势菌属。田瑞杰等^[5]采用宏转录组学技术对浓香型白酒窖池酒醅微生物的差异表达基因进行研究, 发现酒醅微生物的代谢差异富集在RNA降解与糖酵解, 且下层酒醅的微生物对代谢活动的贡献最大, 酒醅发酵过程中微生物群落结构的组成不同, 其代谢也会有所差异。Qian Wei等^[6]对酒醅与窖泥微生物在浓香型白酒发酵过程中有机酸代谢的分工进行研究, 结果表明, 与乙酸、乳酸代谢相关的酶主要富集在酒醅中, 这些酸随后被窖泥菌群代谢为己酸和丁酸, 酒醅与窖泥微生物合力推动浓香型白酒风味的形成。目前的研究主要是对酒醅发酵过程中的微生物群落结构解析, 许多研究表明, 乳杆菌属、芽孢杆菌属、片球菌属、地芽孢杆菌属等是酒醅中的优势细菌属^[7-8], 哈萨克斯坦酵母属 (*Kazachstania*)、热子囊菌属 (*Thermoascus*)、伊萨酵母属等是酒醅中的优势真菌属^[9-10], 但浓香型酒醅中微生物的代谢尚不清晰, 对不同发酵节点的浓香型白酒酒醅微生物的演替规律对代谢功

能的影响研究较少, 对微生物结构的复杂性、多样性及动态变化情况等方面认识不足。

本研究以四川某浓香型窖池不同发酵节点的酒醅作为研究对象, 测定酒醅样品发酵过程中理化指标的变化规律, 并借助高通量测序技术分析酒醅中微生物群落结构, 使用冗余分析 (redundancy analysis, RDA)、相关性分析研究微生物群落结构与理化指标的关联性, 并利用PICRUSt分析发酵过程中酒醅微生物群落代谢的差异, 旨在为明确浓香型白酒的酿造机理提供科学依据, 及为酿造过程中微生物的调控和代谢机制提供研究基础。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

酒醅样品: 酒醅样品取自四川某浓香型白酒厂生产窖池, 每个样品分别于窖池的上、中、下3层采集 (图1), 合并混合均匀后作为该发酵节点的酒醅样品 (约200 g)。在60 d发酵期内, 分别从同一窖池取发酵5、10、15、20、30、40、50、60 d的样品。样品采集后暂存于-20 °C, 并及时进行酒醅微生物基因组DNA提取和理化检测, 每个样品的理化指标检测3次。

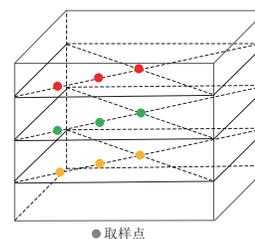


图1 取样点示意图

Fig. 1 Schematic diagram of sampling sites

E.Z.N.A.[®] Soil DNA试剂盒 上海晶诺生物科技有限公司。

1.2 仪器与设备

AR2140电子天平 瑞士梅特勒-托利多仪器有限公司；DL-1电子万用炉 北京市永光明医疗仪器有限公司；T100聚合酶链式反应 (polymerase chain reaction, PCR) 仪、Mini-PROTEAN Tetra电泳仪 美国Bio-Rad公司；PiCo21台式高速离心机 美国Thermo Fisher公司；NanoDrop2000 DNA含量测定仪 美国Illumina公司。

1.3 方法

1.3.1 酒醅理化检测方法

水分含量采用常压干燥法测定；酸度参照DB 34/T 2264—2014《固态发酵酒醅分析方法》采用酸碱滴定法测定；淀粉与还原糖含量采用菲林试剂法^[11]测定。

1.3.2 酒醅DNA的提取

细菌根据E.Z.N.A.[®] Soil DNA试剂盒说明书进行DNA提取，DNA浓度和纯度利用NanoDrop2000 DNA含量测定仪进行检测，同时利用1%琼脂糖凝胶电泳检测DNA提取质量。真菌根据十六烷基三甲基溴化铵法，将提取的DNA加适量含10 ng/ μ L RNase的100 μ L超纯水溶解，37 $^{\circ}$ C孵育1 h，分装2管，置于-20 $^{\circ}$ C保存备用。

1.3.3 PCR扩增

细菌用338F (5'-ACTCCTACGGGAGGCAGCAG-3')和806R (5'-GGACTACHVGGGTWTCTAAT-3')引物对V3~V4可变区进行PCR扩增，扩增程序为：95 $^{\circ}$ C预变性3 min；95 $^{\circ}$ C变性30 s、55 $^{\circ}$ C退火30 s、72 $^{\circ}$ C延伸30 s，27个循环；最后72 $^{\circ}$ C延伸10 min。扩增体系为20 μ L：4 μ L 5 \times FastPfu缓冲液、2 μ L 2.5 mmol/L dNTPs、0.8 μ L引物 (5 μ mol/L)、0.4 μ L FastPfu聚合酶、10 ng DNA模板。真菌通用引物ITS1FI2 (5'-GAACCWGC GGARGGATCA-3')和ITS2 (5'-GCTGCGTTCTTCATCGATGC-3')用于真菌ITS序列的扩增，序列长度205 bp。PCR扩增体系为：模板DNA 100 ng，ITS1FI2 (0.5 μ mol/L)和ITS2 (0.5 μ mol/L)各2.5 μ L，Premix Ex TaqTM Hot Start Version 12.5 μ L，加ddH₂O补至25 μ L。PCR程序：98 $^{\circ}$ C预变性10 s；98 $^{\circ}$ C变性10 s、52 $^{\circ}$ C退火30 s、72 $^{\circ}$ C延伸30 s，33个循环；72 $^{\circ}$ C延伸10 min，4 $^{\circ}$ C保存^[12]。全部样本按照正式实验条件进行，每个样本3个重复，将同一样本的PCR产物混合后用2%琼脂糖凝胶电泳检测。参照电泳初步定量结果，将PCR产物送至上海美吉生物技术有限公司进行测序，用于后续分析。

1.4 数据处理

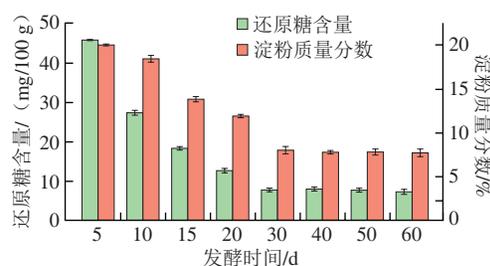
原始测序序列使用Trimmomatic软件质控，使用FLASH软件进行拼接。使用UPARSE软件，根据97%的相似度对序列进行操作分类单元 (operational taxonomic

unit, OTU) 聚类，并在聚类过程中去除单序列和嵌合体。利用RDP classifier对每条序列进行物种分类注释，比对Silva数据库 (SSU123)，参考京都基因与基因组百科全书 (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, KEGG) 数据库 (<https://www.kegg.jp/>)，采用PICRUSt (<https://cloud.majorbio.com/>) 工具对导入的OTU分类信息文件进行在线功能预测，基于KEGG注释结果，将扩增子序列变体 (amplicon sequence variant, ASVs) 与其内参序列比对，把ASVs置入相应的参考树中，推断每个ASV基因家族的拷贝数，预测每个ASV的基因含量，结合MinPath确定每个样本基因家族的丰度；将基因家族信息与KEGG数据库对应的功能进行比对，获得每个样本的功能信息和丰度信息，绘制代谢途径，根据酶的丰度信息绘制气泡图。利用Origin软件分析理化指标的变化规律，酒醅理化数据用平均值 \pm 标准差表示，通过Origin软件及R语言进行微生物群落的变化规律分析、理化指标相关性分析并作图。

2 结果与分析

2.1 酒醅理化指标的变化规律

如图2所示，淀粉含量在发酵前期呈持续下降趋势，30 d后趋于平稳，质量分数维持在7.8%，酒醅在发酵前期淀粉含量较高，细菌、霉菌等迅速繁殖使得糖化酶活力增高，导致还原糖含量升高，但还原糖含量变化在整个发酵过程中呈下降趋势，可能是由于5 d后酵母菌等大量兼性厌氧微生物大量繁殖，还原糖被迅速利用^[13]。发酵后期微生物发酵能力减弱，还原糖与淀粉含量趋于平稳；发酵初期，酒醅中淀粉含量较高，微生物在利用淀粉时产生大量的热量，同时糖化作用会产生大量水分，导致酒醅中的水分含量从发酵初期持续上升，水分含量在60 d达到最高，为74.01%；同时适宜的水分可以调节窖内温度和降低发酵酒醅的酸度，影响酒醅发酵的质量^[14]。酒醅中的有机酸是酒体重要的风味物质并且参与酯化过程，适宜的酸度可以抑制部分有害杂菌的繁殖^[15]。酸度在整个发酵过程中呈上升趋势，在30 d后趋于平稳，60 d时酸度最高，为3.57 mmol/10 g，窖内厌氧与兼性厌氧微生物代谢旺盛是酸度升高的原因之一。



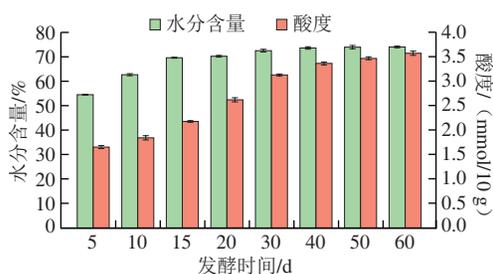


图2 发酵过程中酒醅理化指标的变化

Fig. 2 Changes in physicochemical indicators of fermented grains during fermentation process

2.2 酒醅微生物群落结构的 α 多样性分析

经测序数据的处理, 8个酒醅样品共得到445 296条真菌有效序列和602 328条细菌有效序列, 由表1可知, 所有样品的覆盖率均达到99.84%以上, 表明酒醅样品的测序结果能反映微生物群落全部信息, 经分析, 酒醅中的细菌OTU数量为134~481, 真菌OTU数量为135~293, 说明在发酵过程中, 细菌的物种丰富度高于真菌。细菌Shannon指数为1.16~2.44, 真菌Shannon指数为1.42~2.04, Shannon指数用于衡量物种多样性, 随着发酵进行, 酒醅中细菌的Shannon指数呈先升高后降低的趋势, 这与王鹏^[16]、Zhang Yanyan^[17]等研究结果相似, 这可能是酒醅发酵前期存在大量来源于大曲的微生物, 且酒醅营养丰富, 适宜的酸度使酒醅微生物大量繁殖, 导致酒醅细菌多样性在10 d前增加, 真菌的Shannon指数变化较小。酒醅中细菌的Chao1指数呈先升高后降低的趋势, 而真菌的Chao1指数波动变化, 表明酒醅发酵过程中真菌和细菌的丰度在不断变化。

表1 酒醅中微生物的 α 多样性Table 1 α -Diversity of microbial communities in fermented grains

发酵时间/d	细菌				真菌			
	OTU数量	Chao1指数	Shannon指数	覆盖率/%	OTU数量	Chao1指数	Shannon指数	覆盖率/%
5	186	215.09	1.32	99.99	159	162.35	1.58	99.98
10	481	498.64	2.44	99.84	207	227.16	1.82	99.99
15	362	435.24	2.34	99.86	163	203.46	1.63	99.96
20	306	378.79	2.23	99.94	135	141.24	1.42	99.98
30	264	297.15	2.02	99.97	293	298.71	2.04	99.99
40	198	278.13	1.35	99.99	156	159.68	1.56	99.97
50	164	265.13	1.29	99.98	189	196.29	1.77	99.99
60	134	254.76	1.16	99.99	277	289.96	1.98	99.96

2.3 酒醅发酵过程中细菌群落演替规律

如图3所示, 细菌群落中的厚壁菌门(Firmicutes)、变形菌门(Proteobacteria)、放线菌门(Actinobacteriota)占主导地位; 浓香型发酵酒醅中主要存在12个优势菌属(相对丰度>1%), 分别为*Lactobacillus*、芽孢杆菌属(*Bacillus*)、葡萄球菌属(*Staphylococcus*)、假单胞菌属(*Pseudomonas*)、unclassified_f_Enterobacteriaceae、克雷伯氏菌属

(*Klebsiella*)、高温放线菌属(*Thermoactinomyces*)、*Kroppenstedtia*、不动杆菌属(*Acinetobacter*)、片球菌属(*Pediococcus*)等, 在窖内发酵前期, *Lactobacillus*、*Bacillus*、*Staphylococcus*、*Thermoactinomyces*、*Weissella*、*Pseudomonas*、*Klebsiella*等是优势细菌属, *Bacillus*和*Staphylococcus*的相对丰度分别为5.3%~13.9%和0.4%~15.6%, 随着酒醅发酵进行, *Thermoactinomyces*、*Weissella*的相对丰度迅速下降。发酵15 d后, *Bacillus*、*Staphylococcus*等菌属的相对丰度降低, *Lactobacillus*在发酵15~20 d相对丰度增加29%, 15 d后成为酒醅发酵过程中的绝对优势菌属(相对丰度>89.6%), *Lactobacillus*在酒醅整个发酵过程中占据绝对的优势地位, 相对丰度维持在47%以上, 优势细菌属与高江婧^[18]、翟磊^[19]等研究结果一致。

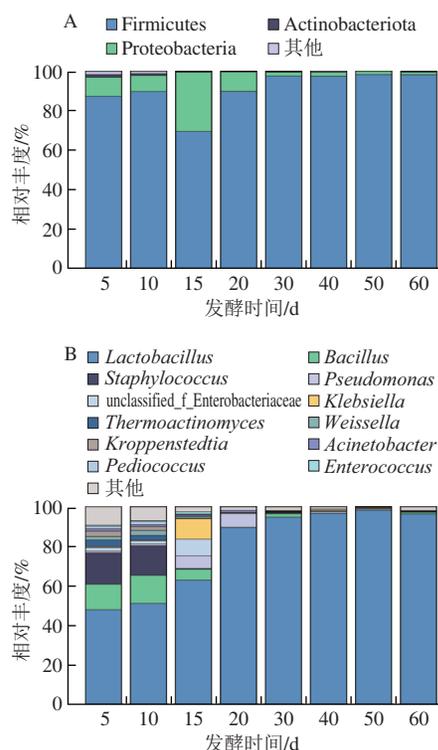


图3 细菌群落结构门水平(A)和属水平(B)组成分布

Fig. 3 Distribution of bacterial community structure at phylum (A) and genus (B) levels

2.4 酒醅发酵过程中真菌群落演替规律

如图4所示, 真菌群落中的子囊菌门(Ascomycota)、担子菌门(Basidiomycota)占主导地位; 浓香型发酵酒醅中主要存在12个优势真菌属(相对丰度>1%), 分别为*Kazachstania*、威克汉姆酵母(*Wickerhamomyces*)、青霉属(*Penicillium*)、unclassified_f_Aspergillaceae、季也蒙酵母属(*Meyerozyma*)、德巴利酵母属(*Debaryomyces*)、假丝酵母菌属(*Candida*)、unclassified_f_Dipodascaceae、

曲霉菌属 (*Aspergillus*)、*Thermoascus*等。其中, *Kazachstania*、*Wickerhamomyces*是浓香型白酒酒醅整个发酵过程中的优势菌属, 在发酵5~10 d *Kazachstania*的相对丰度为47%~53%, 10 d后开始降低, 但始终高于14%; *Penicillium*在发酵30 d相对丰度达到最高(12%), 与细菌群落结构不同的是酒醅发酵过程中真菌存在多个优势菌属, *Meyerozyma*在发酵5~10、40~60 d是优势菌属, *Debaryomyces*在10~15 d相对丰度由0.4%增加到17.0%, *Candida*在10~15、40~60 d是优势菌属之一, 此外*Aspergillus*、*Thermoascus*、嗜热真菌属 (*Thermomyces*)等微生物均为浓香型白酒发酵过程中的优势菌属。

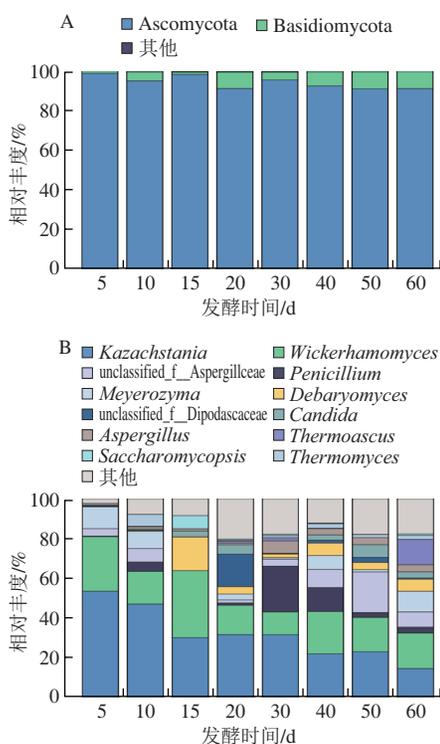


图4 真菌群落结构门水平(A)和属水平(B)组成分布
Fig. 4 Distribution of fungal community structure at phylum (A) and genus (B) levels

综上, 浓香型酒醅细菌以*Lactobacillus*、*Bacillus*、*Staphylococcus*、*Thermoactinomyces*为主, 真菌以*Kazachstania*、*Wickerhamomyces*、*Penicillium*、*Meyerozyma*、*Debaryomyces*、*Candida*、*Aspergillus*为主, 其中*Lactobacillus*、*Kazachstania*、*Wickerhamomyces*占绝对优势。

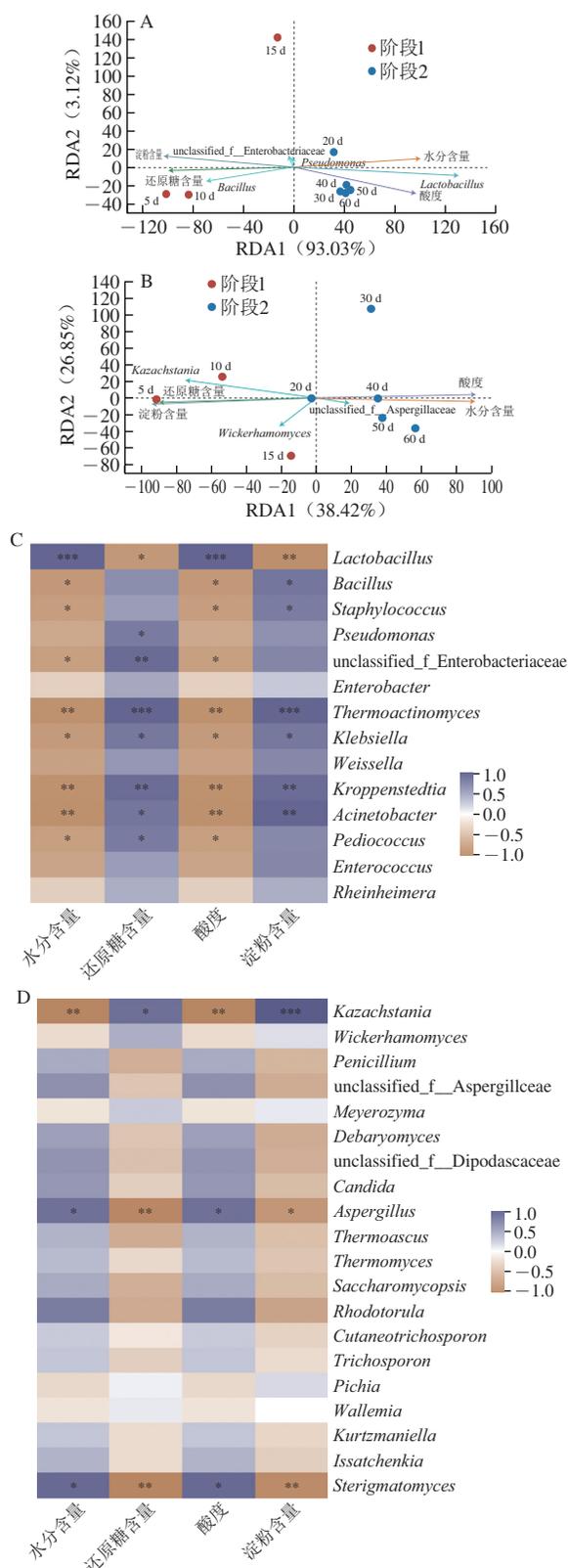
由上述浓香型酒醅微生物群落演替规律可知, 酒醅发酵前期与后期的微生物群落结构存在明显差异, 15~20 d是微生物群落结构剧烈变化的时期, *Lactobacillus*在发酵过程中相对丰度不断升高, 该菌具有较强的碳水化合物代谢能力, 能够将糖类转化为乳酸, 这可能是酒醅发酵过程中酸度不断升高的原因,

同时乳酸能与乙醇通过酯化反应生成浓香型白酒关键风味物质乳酸乙酯, 还可以作为其他脂肪酸的底物^[20]。*Kazachstania*、*Wickerhamomyces*等真菌属在酒醅发酵过程中保持较高的丰度, *Kazachstania*广泛分布于酸面团、泡菜、青贮饲料等植物乳酸发酵过程, 同化乳酸, 并水解葡萄糖醛酸苷作为异型发酵乳酸菌的代谢底物, 促进其利用果糖产乙酸^[21]。*Kazachstania*也是浓香型白酒酒醅微环境的标志性酵母种属之一, 对浓香型白酒风味有重要影响^[22]。Jood等^[23]研究发现, *Kazachstania*对酒体风味的贡献主要体现在异丙醇和异戊醇。研究表明, 浓香型白酒的发酵过程主要是微生物间的共同发酵, 通过互相协调和抑制实现酿造过程中的微生物动态平衡^[24], 微生物在发酵过程中的演替使酒醅菌群代谢更完整, 同时与窖内酒醅的理化环境密切相关。

2.5 酒醅理化指标与微生物群落结构的相关性分析

根据微生物群落结构的组成, 将不同发酵时间的酒醅分为2个阶段(5~15 d和20~60 d), 通过相关性分析阐明酒醅样品、发酵参数与微生物之间的关系。如图5A、B所示, RDA结果显示了细菌群落与真菌群落在样品中的分布, 解释了不同发酵时期理化指标与酒醅样品96.15%和65.27%的关系, 说明样品的分布与理化指标存在一定的相关性。水分、还原糖、淀粉含量对浓香型白酒风味物质具有强烈影响^[25], RDA表明, 发酵前期细菌群落和真菌群落主要受到淀粉与还原糖的影响, *Bacillus*、*Pseudomonas*、*unclassified_f_Enterobacteriaceae*、*Kazachstania*、*Wickerhamomyces*与还原糖、淀粉含量呈正相关, 发酵后期细菌群落和真菌群落主要受到水分含量与酸度的影响, *Lactobacillus*、*Penicillium*、*unclassified_f_Aspergillaceae*与水分含量、酸度呈正相关, 可见在浓香型白酒发酵过程中, 发酵参数的驱动力可能会影响微生物的组成结构。

为了解理化指标对优势菌属的影响, 通过Spearman系数评估微生物与理化指标的相关性, 如图5C、D所示, 水分含量、酸度与*Lactobacillus*呈显著正相关($P < 0.05$), 但与10个细菌属呈显著负相关($P < 0.05$); 还原糖含量与*Lactobacillus*呈显著负相关($P < 0.05$), 与*Pseudomonas*、*Enterobacter*等8个细菌属呈显著正相关($P < 0.05$); 淀粉含量与*Bacillus*、*Staphylococcus*等8个细菌属呈显著正相关($P < 0.05$)。淀粉和还原糖含量与真菌中的*Kazachstania*呈显著正相关($P < 0.05$), 与其他菌属呈负相关, 但相关性未达到显著水平, 水分含量和酸度与*Kazachstania*呈显著正相关($P < 0.05$), 可见浓香型白酒发酵过程中的理化指标对真菌群落的影响较小, 相关性分析表明, 酒醅的酸度、水分、淀粉、还原糖含量与微生物菌群显著相关, 有研究表明, 水分、还原糖、淀粉含量可作为酒醅微生物调控和香气调控的指标, 从而间接调节白酒的风味和品质, 理化指标对浓香型白酒风味物质的影响通过微生物代谢实现^[26]。



A. 理化指标与细菌属的相关性RAD; B. 理化指标与真菌属的相关性RAD; C. 细菌属相关性热图; D. 真菌属相关性热图。* 显著相关 ($P < 0.05$), ** 极显著相关 ($P < 0.01$), *** 高度显著相关 ($P < 0.001$)。

图5 酒醅发酵过程中理化指标与微生物相关性分析

Fig. 5 Analysis of correlation between physicochemical indicators and microbial communities

2.6 酒醅发酵过程中微生物代谢的变化

结合酒醅微生物物种注释结果和KEGG数据库绘制代谢图,浓香型白酒酒醅发酵过程中微生物主要参与的代谢包括糖酵解、乙醇合成、酸代谢等(图6A),不同发酵时期的微生物群落组成结构不同,解析不同发酵时期酒醅中微生物的潜在功能有利于了解发酵特性,通过PICRUSt标记基因序列预测不同发酵阶段酒醅微生物群落的功能酶及其丰度信息,并绘制气泡图,如图6B所示,随*Penicillium*、*Aspergillus*相对丰度的增加,糖原磷酸化酶(EC2.4.1.1)、磷酸葡萄糖变位酶(EC5.4.2.2)、葡萄糖-6-磷酸异构酶(EC5.3.1.9)、果糖二磷酸酶(EC3.1.3.11)等表达水平开始上调,这些酶与淀粉代谢密切相关,这也解释了淀粉含量在发酵10 d后迅速降低的原因,30 d后降低缓慢,淀粉会转化为乙醇,可见前30 d是酒醅的主发酵期,发酵后期是微生物代谢产物的平衡。*Lactobacillus*在酒醅发酵过程中丰度不断增加,与之相关的磷酸甘油酸激酶(EC2.7.2.3)、磷酸甘油酸变位酶(EC5.4.2.11、EC5.4.2.12)、磷酸烯醇式丙酮酸(EC4.2.1.11)、丙酮酸激酶(EC2.7.1.40)以及乳酸脱氢酶(EC1.1.1.27)多种酶的表达水平逐渐增高,表明可能是由于酒醅中乳酸脱氢酶的高表达积累了大量乳酸,使酒醅的酸度在发酵过程中不断升高,*Lactobacillus*的存在可能影响糖酵解代谢过程中酶的表达。乙醛可以由乙醇脱氢生成,脱氢酶作为产乙醛途径的关键酶,其在发酵中期的表达有利于乙醛的积累及浓香型白酒的酸代谢,该过程可能涉及*Kazachstania*、*Sterigmatomyces*的参与,这些菌属能够分泌淀粉酶及纤维素酶,也能够为酒醅发酵前期为其他微生物提供营养物质,同时与酵母之间的相互作用影响原料的出酒率^[27]。

乙酰辅酶A是酸代谢途径中合成脂肪酸的关键前体物质,醋酸辅酶A转移酶(EC2.8.3.8)是己酸代谢途径的关键酶,该酶在发酵中期的表达水平较高,有利于浓香型白酒主体风味己酸乙酯前体物质己酸的合成,该过程可能涉及*Bacillus*、*Staphylococcus*等菌属的参与,*Bacillus*是酒醅中的重要功能菌,为白酒酿造过程提供丰富的淀粉酶或蛋白酶,对白酒风味物质具有重要影响^[28]。黄治国等^[29]将芽孢杆菌应用于小曲酒发酵,降低了小曲酒的高级醇含量。*Staphylococcus*能够丰富浓香型白酒的风味,具有促进乙醇、醛类和酯类物质合成的潜力。通过PICRUSt预测发现,糖酵解代谢相关的功能酶在发酵前期较活跃,酸代谢相关的功能酶在发酵中后期较活跃,并且这些酶与酒醅中的优势菌属相关,可见在发酵过程中酒醅微生物的演替有利于浓香型白酒风味的形成。

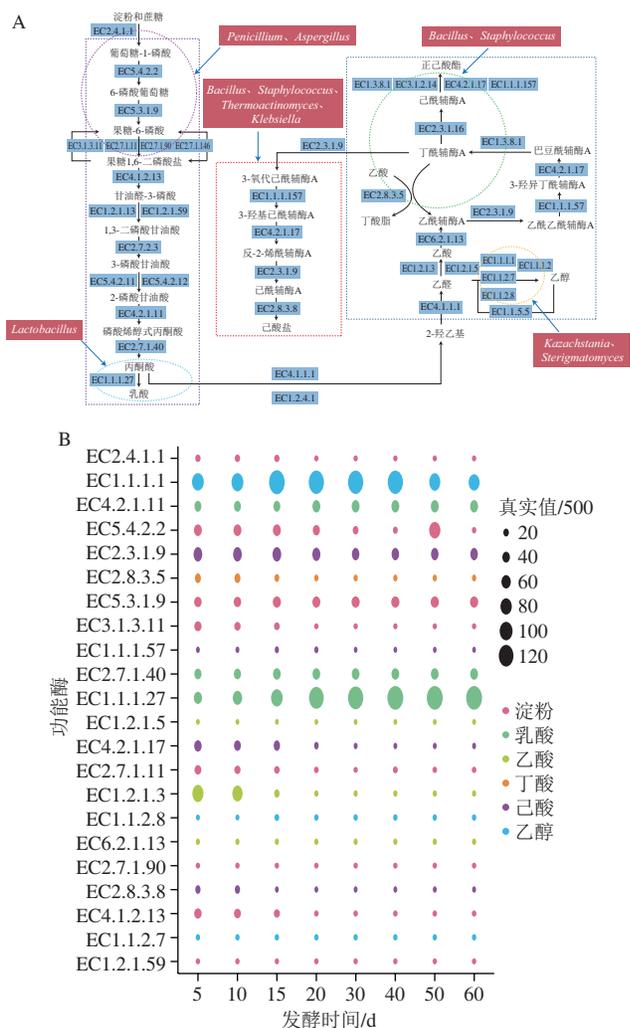


图6 酒醅微生物参与的代谢 (A) 及其相关酶的丰度变化 (B)

Fig. 6 Metabolism involving microorganisms in fermented grains (A) and changes in the abundance of associated enzymes (B)

3 结论

本研究基于高通量测序技术研究浓香型酒醅微生物的群落演替规律及潜在的代谢功能, 结果表明: 在门水平, Firmicutes、Proteobacteria、Actinobacteriota、Ascomycota、Basidiomycota是酒醅中的优势菌门, 在属水平, *Lactobacillus*是发酵15 d之后酒醅中的绝对优势细菌属, *Kazachstania*、*Wickerhamomyces*是整个发酵过程中酒醅的优势真菌属, 细菌多样性随着发酵的进行不断降低, 真菌多样性在发酵过程中较为稳定, 理化指标与细菌群落的相关性更强; 通过功能预测发现, *Penicillium*、*Aspergillus*主要参与糖酵解代谢, 该过程葡萄糖被降解为丙酮酸, 随后在厌氧条件下被*Lactobacillus*还原成乳酸, *Bacillus*、*Staphylococcus*等涉及乙酸、丁酸、己酸的代谢, *Kazachstania*、*Sterigmatomyces*等涉

及乙醇的合成, 酒醅中微生物群落结构的变化影响糖酵解、酸代谢、乙醇合成相关的酶, 说明浓香型酒醅微生物的演替规律与风味物质代谢密切相关, 目前关于浓香型酒醅微生物与风味物质代谢的机制尚不清晰, 这将是后期研究的重点。综上所述, 本研究解析了浓香型白酒酒醅微生物的演替规律及其功能预测, 为深入研究酒醅微生物在酿造过程中的作用提供了研究基础。

参考文献:

- HE Y X, LIU Z P, QIAN M, et al. Unraveling the chemosensory characteristics of strong-aroma type Baijiu from different regions using comprehensive two-dimensional gas chromatography-time-of-flight mass spectrometry and descriptive sensory analysis[J]. Food Chemistry, 2020, 331(30): 127335. DOI:10.1016/j.foodchem.2020.127335.
- 侯小歌, 王俊英, 李学思, 等. 浓香型白酒糟醅及窖泥产香功能菌的研究进展[J]. 微生物学通报, 2013, 40(7): 1257-1265. DOI:10.13344/j.microbiol.china.2013.07.011.
- 刘凡, 周新虎, 陈翔, 等. 洋河浓香型白酒发酵过程酒醅微生物群落结构解析及其与有机酸合成的相关性[J]. 微生物学报, 2018, 58(12): 2087-2099. DOI:10.13343/j.cnki.wsx.20170616.
- 肖辰, 陆震鸣, 张晓娟, 等. 泸型酒酒醅细菌群落的发酵演替规律[J]. 微生物学报, 2019, 59(1): 195-204. DOI:10.13343/j.cnki.wsx.20180123.
- 田瑞杰, 张勇, 冯大鸿, 等. 基于宏转录组学的浓香型白酒酒醅活性微生物群落空间异质性研究[J]. 轻工学报, 2022, 37(1): 1-11. DOI:10.12187/2022.01.001.
- QIAN W, LU Z M, CHAI L J, et al. Cooperation within the microbial consortia of fermented grains and pit mud drives organic acid synthesis in strong-flavor Baijiu production[J]. Food Research International, 2021, 147: 110449. DOI:10.1016/j.foodres.2021.110449.
- 胡晓龙, 王康丽, 余苗, 等. 浓香型酒醅微生物菌群演替规律及其空间异质性[J]. 食品与发酵工业, 2020, 46(10): 66-73. DOI:10.13995/j.cnki.11-1802/ts.023321.
- 翟磊, 于学健, 冯慧军, 等. 宜宾产区浓香型白酒酿造生境中细菌的群落结构[J]. 食品与发酵工业, 2020, 46(2): 18-24. DOI:10.13995/j.cnki.11-1802/ts.022600.
- 侯海波, 罗惠波, 黄治国, 等. 浓香型白酒酒醅真菌群落结构及其变化规律[J]. 食品与发酵工业, 2012, 38(5): 42-46. DOI:10.13995/j.cnki.11-1802/ts.2012.05.035.
- MEI J J, LIU X J, LIU X Y, et al. Metabolomics analysis of the metabolic effects of citric acid on *Issatchenkia terricola* WJL-G4[J]. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2023, 136(6): 452-461. DOI:10.1016/j.jbiosc.2023.09.006.
- 胡晓龙, 冯大鸿, 张勇, 等. 浓香型酒醅中梭菌群落演替及其与理化性质的相关性分析[J]. 食品与发酵工业, 2023, 49(5): 94-100. DOI:10.13995/j.cnki.11-1802/ts.031918.
- 卫春会, 甄攀, 张兰兰, 等. 汾酒酒醅发酵过程中真菌群落的变化规律[J]. 食品科学, 2021, 42(14): 121-128. DOI:10.7506/spkx.1002-6630-20200408-114.
- 李艳婷, 郭尚, 郭霄飞, 等. 清香型白酒发酵过程中微生物群落结构变化及与理化性质的相关性[J]. 中国食品学报, 2023, 23(5): 330-340. DOI:10.16429/j.1009-7848.2023.05.033.
- 钱玮, 陆震鸣, 柴丽娟, 等. 泸型酒酒醅与窖泥中梭菌群落结构、演替和功能差异[J]. 生物工程学报, 2020, 36(6): 1190-1197. DOI:10.13345/j.cjb.190456.

- [15] XU S S, ZHANG M Z, XU B Y, et al. Microbial communities and flavor formation in the fermentation of Chinese strong-flavor Baijiu produced from old and new Zaopei[J]. Food Research International, 2022, 156: 111162. DOI:10.1016/j.foodres.2022.111162.
- [16] 王鹏, 蒋超, 常强, 等. 绵甜型白酒酒醅原核微生物群落结构分析[J]. 食品科学技术学报, 2018, 36(5): 19-25. DOI:10.3969/j.issn.2095-6002.2018.05.004.
- [17] ZHANG Y Y, ZHU X Y, LI X Z, et al. The process-related dynamics of microbial community during a simulated fermentation of Chinese strong-flavored liquor[J]. BMC Microbiology, 2017, 17(1): 196. DOI:10.1186/s12866-017-1106-3.
- [18] 高江婧, 任聪, 刘国英, 等. 浓香型白酒酒醅风味物质和微生物菌群结构随发酵时间的变化规律[J]. 食品与发酵工业, 2019, 45(20): 1-6. DOI:10.13995/j.cnki.11-1802/ts.021271.
- [19] 翟磊, 于学健, 冯慧军, 等. 宜宾产区浓香型白酒酿造生境中细菌群落结构的研究[J]. 食品与发酵工业, 2020, 46(2): 18-24. DOI:10.13995/j.cnki.11-1802/ts.022600.
- [20] DU R B, WU Q, XU Y. Chinese liquor fermentation: identification of key flavor-producing *Lactobacillus* spp. by quantitative profiling with indigenous internal standards[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2020, 86(12): e00456-20. DOI:10.1128/AEM.00456-20.
- [21] DECIMO M, QUATTRINI M, RICCI G, et al. Evaluation of microbial consortia and chemical changes in spontaneous maize bran fermentation[J]. AMB Express, 2017, 7(1): 205. DOI:10.1186/s13568-017-0506-y.
- [22] 游玲, 周荣清, 谭壹, 等. *Kazachstania*属酵母在浓香型白酒糟醅中的分布特征及发酵功能[J]. 生物技术通报, 2021, 37(6): 108-116. DOI:10.13560/j.cnki.biotech.bull.1985.2020-1159.
- [23] JOOD I, HOFF J W, SETATI M E. Evaluating fermentation characteristics of *Kazachstania* spp. and their potential influence on wine quality[J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2017, 33(7): 129. DOI:10.1007/s11274-017-2299-1.
- [24] CHEN S Q, HUANG J, QIN H, et al. Characterizing the interaction relationship of the microbial communities between *Zaopei* and pit mud disturbing by Daqu[J]. Food Science and Biotechnology, 2021, 30(10): 1357-1367. DOI:10.1007/s10068-021-00975-z.
- [25] LI H H, QIN D, WU Z Y, et al. Characterization of key aroma compounds in Chinese Guojing sesame-flavor Baijiu by means of molecular sensory science[J]. Food Chemistry, 2019, 284(30): 100-107. DOI:10.1016/j.foodchem.2019.01.102.
- [26] ZHANG M Z, WU X F, MU D D, et al. Profiling the influence of physicochemical parameters on the microbial community and flavor substances of zaopei[J]. Journal of Science Food and Agriculture, 2021, 101(15): 6300-6310. DOI:10.1002/jsfa.11299.
- [27] PERRONE G, SUSCA A. *Penicillium* species and their associated mycotoxins[J]. Methods in Molecular Biology, 2017, 1542: 107-119. DOI:10.1007/978-1-4939-6707-0_5.
- [28] ZHAO X X, XIANG F S, TANG F X, et al. Bacterial communities and prediction of microbial metabolic pathway in rice wine koji from different regions in China[J]. Frontiers in Microbiology, 2022, 3(12): 748779. DOI:10.3389/fmicb.2021.748779.
- [29] 黄治国, 罗润森, 李彦中, 等. 芽孢杆菌强化发酵降低小曲白酒中高级醇的含量[J]. 现代食品科技, 2023, 39(2): 145-151. DOI:10.13982/j.mfst.1673-9078.2023.2.0251.