

张凯, 黄韦菁, 向绪军, 等. 兰陵酒业高温大曲细菌类群与理化指标关联性分析 [J]. 食品工业科技, 2024, 45(19): 124–132. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2023080310

ZHANG Kai, HUANG Weijing, XIANG Xujun, et al. Correlation Analysis between Bacterial Taxa and Physicochemical Indexes of High-temperature Daqu in Lanling Wine[J]. Science and Technology of Food Industry, 2024, 45(19): 124–132. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2023080310

· 生物工程 ·

兰陵酒业高温大曲细菌类群与理化指标 关联性分析

张 凯^{1,2}, 黄韦菁^{1,2}, 向绪军^{1,2}, 管桂坤³, 刘 宇³, 郭 壮^{1,2}, 王玉荣^{1,2,*}
(1.湖北文理学院湖北省食品配料工程技术研究中心, 湖北襄阳 441053;
2.襄阳市酱香型白酒固态发酵企校联合创新中心, 湖北襄阳 441053;
3.山东兰陵美酒股份有限公司, 山东兰陵 277731)

摘 要:为分析山东临沂地区高温大曲细菌类群及其理化特性, 本研究采用 Illumina MiSeq 高通量测序技术和纯培养技术对兰陵酒业高温大曲中细菌类群进行了解析, 通过常规检测方法对其理化指标进行了测定, 探究大曲中细菌类群与理化指标之间的关联性。结果表明, 大曲中细菌属主要为克罗彭斯特德菌属 (*Kroppenstedtia*)、高温放线菌属 (*Thermoactinomyces*)、糖多孢菌属 (*Saccharopolyspora*)、葡萄球菌属 (*Staphylococcus*)、红球菌属 (*Rhodococcus*)、魏斯氏菌属 (*Weissella*) 和芽孢杆菌属 (*Bacillus*) 等。*Bacillus subtilis*、*Bacillus licheniformis* 和 *Bacillus coagulans* 为可培养优势细菌分离株。15 份高温大曲间糖化力、酯化力、酒化力和液化力差异较大。*Kroppenstedtia*、*Staphylococcus*、*Leucobacter*、*Rhodococcus* 和 *Weissella* 与酯化力、发酵力、酒化力、酯化力和液化力间呈现显著相关性 ($P < 0.05$)。由此可见, 兰陵酒业高温大曲中存在大量核心细菌类群, 且各细菌属与理化指标间存在明显相关性, 进一步为该地区高温大曲品质的改善与提升提供参考。

关键词: 高温大曲, 高通量测序技术, 细菌类群, 理化指标, 相关性

中图分类号: TS201.3

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2024)19-0124-09

DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2023080310

本文网刊:



Correlation Analysis between Bacterial Taxa and Physicochemical Indexes of High-temperature Daqu in Lanling Wine

ZHANG Kai^{1,2}, HUANG Weijing^{1,2}, XIANG Xujun^{1,2}, GUAN Guikun³, LIU Yu³, GUO Zhuang^{1,2},
WANG Yurong^{1,2,*}

(1. Hubei Provincial Engineering and Technology Research Center for Food Ingredients, Hubei University of Arts and Science, Xiangyang 441053, China;

2. Xiangyang Jiangxiang Baijiu Solid State Fermentation Enterprise-School Joint Innovation Center, Xiangyang 441053, China;

3. Shandong Lanling Meijiu Co., Ltd., Lanling 277731, China)

Abstract: In order to analyze the high-temperature Daqu bacterial taxa and their physicochemical properties in Linyi area, Shandong Province, Illumina MiSeq high-throughput sequencing technology and pure culture technology were used to analyze the bacterial taxa of high-temperature Daqu in Lanling wine, and then the physicochemical indexes were determined by conventional detection methods in this study. Finally, the correlation between bacterial taxa and physicochemical indexes in Daqu was explored. The results showed that the main genera of bacteria in Daqu were

收稿日期: 2023-09-04

基金项目: 湖北省自然科学基金计划襄阳创新发展联合基金项目 (2023AFD049); 湖北文理学院大学生创新创业训练计划项目 (2024); 湖北文理学院教师科研能力培育基金“科技创新团队” (2020kpytd009)。

作者简介: 张凯 (2001-), 男, 本科, 研究方向: 食品生物技术, E-mail: 1968873005@qq.com。

* 通信作者: 王玉荣 (1993-), 女, 博士, 讲师, 研究方向: 食品生物技术, E-mail: wangyurong1993@163.com。

Kroppenstedtia, *Thermoactinomyces*, *Saccharopolyspora*, *Staphylococcus*, *Rhodococcus*, *Weissella* and *Bacillus*, et al. *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis* and *Bacillus coagulans* were cultureable dominant bacterial isolates. There was a large difference in saccharification, esterification, alcoholization and liquefaction between the 15 parts of high-temperature Daqu. *Kroppenstedtia*, *Staphylococcus*, *Leucobacter*, *Rhodococcus* and *Weissella* were significantly positively correlated with esterification, fermentation, alcoholization, esterification and liquefaction ($P<0.05$). Thus, there are a large number of core bacterial taxa in high-temperature Daqu in Lanling wine, and there is a significant correlation between various bacterial genera and physicochemical indexes, which further provides a reference for the improvement and enhancement of the quality of high-temperature Daqu in this area.

Key words: high-temperature Daqu; high-throughput sequencing technology; bacterial taxa; physicochemical indexes; correlation

高温大曲作为酱香型白酒重要的发酵剂和糖化剂,其以小麦、大麦和豌豆为主要原料,经定型、发酵和成熟而成,含有丰富的微生物和各种酶类,是酱香型白酒酿造过程中的内在驱动力^[1]。高温大曲在制曲发酵过程中,由于曲室原有位置的湿度、湿度和氧浓度等环境因素差异导致大曲内部发生不同程度褐变,根据颜色一般分为黑色、白色和黄色三种大曲^[2]。在特殊高温发酵环境下,大曲内部微生物群落结构的演替和酶系的有效富集均会被实现,从而达到原料降解和代谢发酵的功能^[3]。且随着发酵温度的升高,大部分不耐高温的酵母菌和霉菌逐渐消亡,大曲内部微生物以细菌为主开始繁殖,并形成了独特的微生物群落结构^[4]。因此,积极开展对高温大曲中细菌群落多样性的研究,是充分认识其酿造微生物资源和提高产品品质的前提和基础。

近年来,以 MiSeq 为代表的第二代高通量测序技术不仅被广泛应用于分析各种白酒大曲的微生物群落结构,还被用于揭示微生物群落与大曲品质的关系,且与传统纯培养技术相比该技术可准确检测出难以培养、丰度较低和休眠状态下的微生物^[5]。例如,CAI 等^[6]使用高通量测序技术和电子感官技术对低温大曲的微生物多样性和品质特征进行了全面研究,发现细菌主要影响大曲滋味品质,而真菌主要影响大曲风味品质。何猛超等^[7]采用高通量测序技术对贵州茅台地区高温大曲的细菌群落结构进行了解析,发现细菌属主要为高温放线菌属(*Thermoactinomyces*)、芽孢杆菌属(*Bacillus*)、大洋芽孢杆菌属(*Oceanobacillus*)和乳杆菌属(*Lactobacillus*)。WANG 等^[8]采用同样的方法对湖北襄阳地区高温大曲的细菌群落结构进行了解析,发现主要细菌属为 *Thermoactinomyces*、葡萄球菌属(*Staphylococcus*)、慢生芽孢杆菌属(*Lentibacillus*)、*Bacillus*、克罗彭斯特德菌属(*Kroppenstedtia*)和糖多孢菌属(*Saccharopolyspora*)等。由此可见,虽然不同地区高温大曲中细菌类群均以嗜热细菌属为主,但其菌群种类存在明显差异,因而增加高温大曲的采集来源并积极探索其内部细菌类群的结构特征是极为必要的。除此之外,理化指标亦为反映大曲品质的重要参数。LIU 等^[9]的研究表明,微生物的代谢活动会影响大曲的理化性质,进而影响大曲的功能表现和白酒风味形成。因此,积极开

展对高温大曲中微生物群落与各理化指标之间的关联性研究对白酒生产具有重要意义。

黄淮流域产区是中国酿造白酒核心产区之一,横跨河南、江苏、山东和安徽四省。其中,兰陵酒业位于山东省临沂市,该地区地处鲁中南低山丘陵区东南部和鲁东丘陵南部,四季分明,雨量充沛且雨热同季,属温带季风区大陆性气候,该地区可能蕴含了较为丰富的酿酒微生物资源,然而目前针对该地区高温大曲微生物多样性的研究尚少,且微生物群落与大曲理化指标间的关系尚不明确。因此,本研究以兰陵酒业高温大曲为研究对象,采用 Illumina MiSeq 高通量测序技术和纯培养技术对大曲内部细菌类群结构进行解析,同时使用常规检测方法对其理化指标进行测定,继而揭示大曲中细菌类群与理化指标间的关联性,以为后续临沂地区酿酒微生物资源的挖掘和大曲品质变化的机理提供理论依据和数据支撑。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

高温大曲 采集自山东省临沂市(E117°24'~119°11', N34°22'~36°13')兰陵酒业制曲车间,从同一批次、同一曲房和同一班组中曲堆不同位置随机选取黄色成品曲共 15 份,编号为 LL1~LL15,运送到实验室后及时粉碎并于-20℃下保存。大曲以纯小麦为生产原料,加入深井水对其进行润料再辊磨粉碎,粉碎后二次加入深井水进行拌料,拌料均匀后输送到压曲机制作曲坯,待曲坯成型后立即入房排列进行卧曲,再于 65℃条件下发酵培养 40 d,曲坯培养至曲心水分基本全部蒸发,品温降至接近室温时,曲已培养成熟,即可将曲块出房入库;营养琼脂(nutrient agar, NA)培养基 青岛高科技工业园海博生物技术有限公司;宏基因组 DNA 提取试剂盒 德国 QIAGEN 公司; dNTP 缓冲液、rTaq 酶、DNA 聚合酶、pMD18-T 载体 大连宝生物工程有限公司; Axygen 清洗试剂盒 康宁生命科学吴江有限公司;引物 338F/806R、27F/1495R、M13F(-47)/M13R(-48) 上海桑尼生物科技有限公司; MiSeq 测序配套试剂 美国 Illumina 公司;其他试剂均为国产分析纯。

LRH-250 生化恒温培养箱 上海力辰仪器科技

有限公司; Veriti 梯度基因扩增仪 美国 ABI 公司; DYY-12 电泳仪 北京六一仪器厂; UVPCDS8000 凝胶成像分析系统 美国 ProteinSimple 公司; Illumina MiSeq PE300 高通量测序平台 美国 Illumina 公司; R920 机架式服务器 美国 Dell 公司。

1.2 实验方法

1.2.1 宏基因组 DNA 提取、PCR 扩增及高通量测序 准确称取 3.0 g 高温大曲样品于 8 mL pH 为 7.4 的磷酸盐缓冲溶液中充分振荡, 经 800 r/min 离心 10 min 后, 取上清液 13000 r/min 继续离心 10 min 并收集菌体, 使用 QIAGEN DNeasy mericon Food Kit 试剂盒对高温大曲细菌的宏基因组 DNA 进行提取。将提取的 DNA 存放于 -20 °C 冰箱中备用。参照 WANG 等^[8]的方法, 使用正反向引物 338F(5'-ACTCCTACGGGAGGCAGCAG-3')/806R(5'-GGA CTACHVGGGTWTCTAAT-3')对细菌 16S rRNA V₃~V₄ 区基因序列进行 PCR 扩增, 其中扩增条件为: 95 °C 5 min, 95 °C 1 min, 58 °C 45 s, 72 °C 1 min, 30 个循环, 72 °C 7 min。使用 1% 的琼脂糖凝胶电泳和微量紫外分光光度计对 PCR 产物进行检测, 将 OD₂₆₀/OD₂₈₀ 在 1.8~2.0 之间的 PCR 产物稀释至 100 nmol/L 后寄送至上海美吉生物医药科技有限公司的 MiSeq 高通量测序平台完成双末端测序。

1.2.2 生物信息学分析 本研究使用 QIIME(v1.9.0) 平台进行生物信息学分析。首先将测序返回的序列进行拼接并参照 CAI 等^[6]的质控条件对其进行高质量筛选, 利用 PyNAST 对序列进行校准, 继而使用 UCLUST 根据 97% 相似度构建分类操作单元(operational taxonomic units, OTU)^[10], 使用 Chimeraslayer 去除嵌合体后, 从每个 OTU 中选取具有代表性的序列在各数据库^[11-13]中进行比对以确定其分类学地位。

1.2.3 高温大曲中细菌的分离鉴定 使用 0.85% 浓度的生理盐水对高温大曲中细菌进行倍比稀释, 取 10⁻⁴ 和 10⁻⁵ 梯度稀释液涂布于 NA 琼脂培养基上, 于 30 °C 生化培养箱中倒置培养 36 h, 继而采用平板划线法对细菌菌株进行纯化并于 -80 °C 下甘油保藏备用。参照倪慧等^[14]的方法采用 CTAB 法对分离菌株进行 DNA 的提取, 并以其为模板使用扩增引物 27F/1495R 进行 PCR 扩增, 继而使用 Axygen PCR 清洁试剂盒进行清洗, 并进一步对其进行连接转化后挑取阳性克隆子送往上海赛恒生物科技有限公司进行测序, 将返回的序列在 NCBI 网站(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)上与模式菌株进行比对进而明确其分类地位。

1.2.4 高温大曲理化指标的测定 大曲酸度、水分、氨基酸态氮、灰分、淀粉含量、糖化力、酯化力、发酵力、酒化力和液化力的测定方法具体参照 QB/T 4257-2011《酿酒大曲通用分析方法》。使用凯氏定

氮法测定大曲中蛋白质含量^[15], 大致步骤为: 精确称取曲粉样品 0.2 g(精确到 0.1 mg)于消化管中, 继续加入 0.2 g 硫酸铜、3 g 硫酸钾和浓硫酸 8.0 mL 进行充分混合并消化, 同时准备空白试样, 其中消化模式为直线升温式, 条件为 420 °C 维持 90 min, 待消化完成后将消化管取出, 冷却至室温, 继而在全自动凯氏定氮仪上进行测定。

1.3 数据处理

使用 R(v4.1.3)软件绘制箱型图、气泡图、瀑布图和相关性热图, 使用 MEGA 7.0 软件绘制系统发育树, 使用 Excel 2010 绘制复合饼图, 基于在线网站(<http://jvenn.toulouse.inra.fr/app/example.html>)绘制 Venn 图。

2 结果与分析

2.1 高温大曲细菌类群 α 多样性分析

本研究参照 GB 4789.2-2022《食品安全国家标准 食品微生物学检验菌落总数测定》对高温大曲细菌菌落总数进行了计数, 发现其总数范围在 6.51~7.19 lg CFU/g。基于此, 本研究进一步采用 MiSeq 高通量测序技术对高温大曲中细菌类群进行了解析, 发现从 15 份高温大曲中共获得 862353 条高质量 16S rRNA 序列, 平均每份大曲样品 57490 条, 经 97% 相似度划分后共得到 37426 个 OTU。高温大曲细菌类群的 α 多样性结果如图 1 所示。

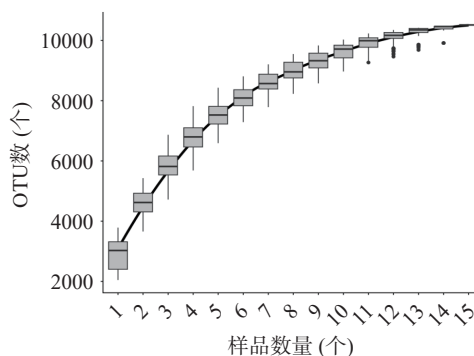


图1 高温大曲中细菌物种累积箱型图

Fig.1 Box diagram of bacterial species accumulation in high-temperature Daqu

由图 1 可知, 随着大曲样品数量的增加, 虽然物种累积曲线一直持续上升, 但其上升幅度在逐渐减小, 且于第 15 个样品中增加的物种数几乎为零, 这表明纳入本研究的样品几乎涵盖了大曲中所有细菌物种。由此可见, 本研究的样品量和测序深度均满足后续分析的要求。

2.2 高温大曲细菌类群结构分析

纳入本研究的所有大曲中平均相对含量 >1.0% 的细菌门和属被定义为优势细菌门和属, 平均相对含量 <1.0% 的细菌门和属归为“Others”。经序列比对分析, 15 份高温大曲共鉴定到 13 个门、29 个纲、54 个目、120 个科和 224 个属。为明确兰陵酒业高温大曲中细菌类群结构特征, 本研究对其平均相对

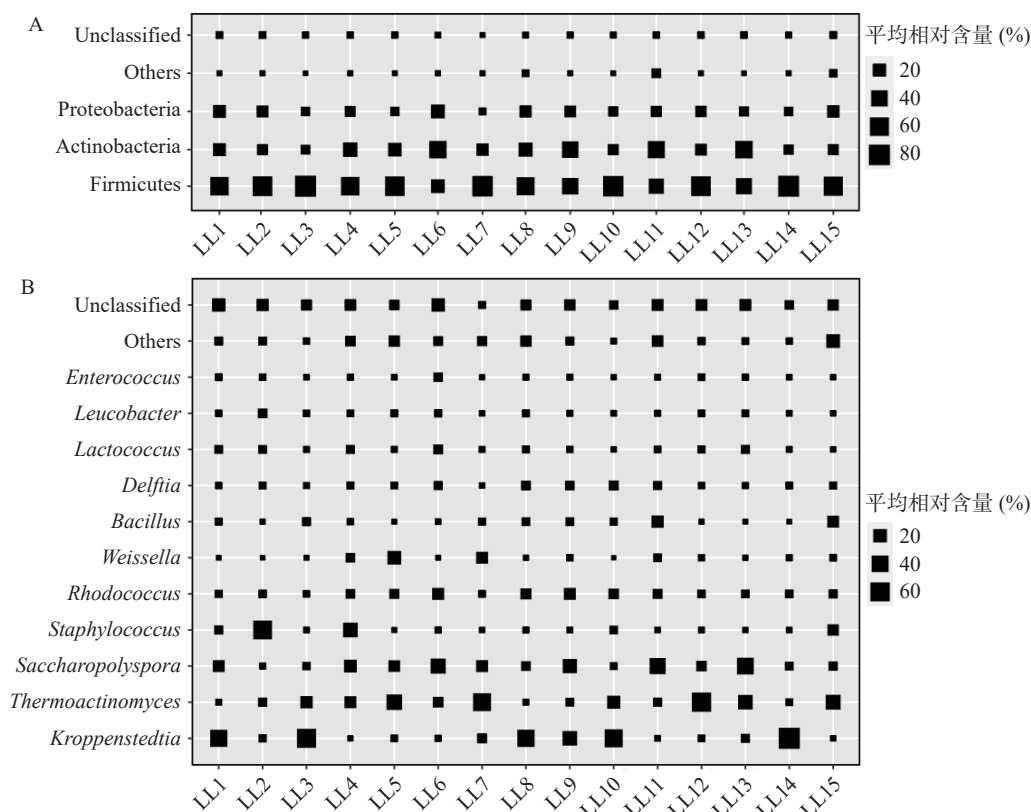


图 2 平均相对含量>1.0% 的细菌门(A)和细菌属(B)分布

Fig.2 Distribution of bacterial phylum (A) and genus (B) with an average relative abundance of >1.0%

含量>1.0% 的细菌门和属组成情况进行了解析,其气泡图如图 2 所示。

由图 2A 可知,在门水平上,纳入本研究的高温大曲中存在 3 个优势细菌门,分别为厚壁菌门(Firmicutes)、放线菌门(Actinobacteria)和变形菌门(Proteobacteria),其平均相对含量分别为 62.02%、24.39% 和 11.48%。由图 2B 可知,在属水平上,纳入本研究的高温大曲中存在 11 个优势细菌属,分别为 *Kroppenstedtia*、*Thermoactinomyces*、*Saccharopolyspora*、*Staphylococcus*、红球菌属(*Rhodococcus*)、魏斯氏菌属(*Weissella*)、*Bacillus*、代尔夫特菌属(*Delftia*)、乳球菌属(*Lactococcus*)、亮杆菌属(*Leucobacter*)和肠球菌属(*Enterococcus*),其平均相

对含量分别为 21.81%、18.21%、14.35%、7.34%、5.76%、3.30%、3.22%、3.01%、2.22%、1.62% 和 1.14%。

将所有大曲中均存在的 OTU 定义为核心 OTU,本研究进一步在 OTU 水平上分析了高温大曲的细菌类群结构,结果如图 3 所示。

由图 3A 可知,纳入本研究 15 份高温大曲中核心 OTU 有 173 个,包含了 571999 条序列,占高质量序列数的 66.33%。由图 3B 可知,平均相对含量>1.0% 的核心 OTU 仅有 15 个,占核心 OTU 总数的 8.67%。其中有 3 个核心 OTU 隶属于 *Thermoactinomyces*,分别为 OTU31065、OTU938 和 OTU2367,累积平均相对含量为 13.24%。另有 3 个隶属于 *Kroppenstedtia*,分别为 OTU10073、OTU35053 和

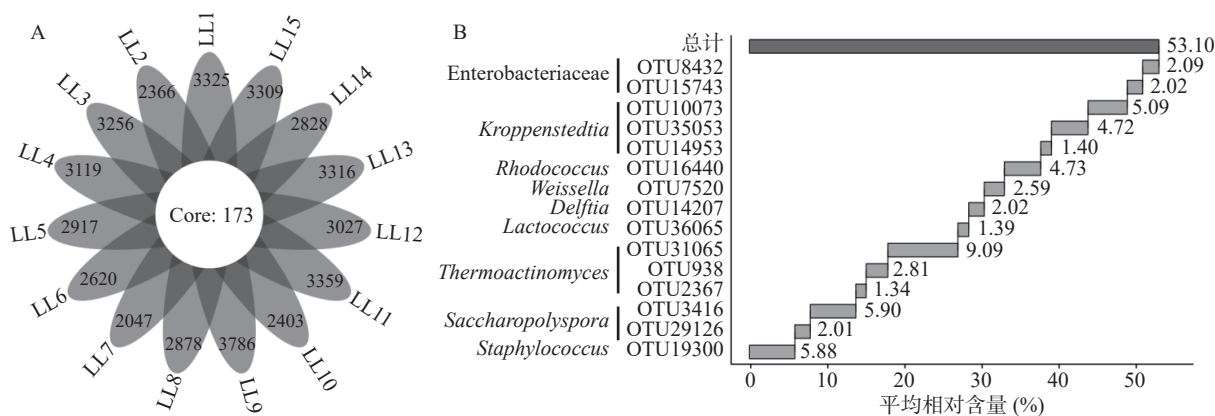


图 3 基于 OTU 水平的 Venn 图(A)和平均相对含量>1.0% 的核心 OTU 瀑布图(B)

Fig.3 Venn plot based on OTU level (A) and waterfall plot of core OTU with an average relative abundance of >1.0% (B)

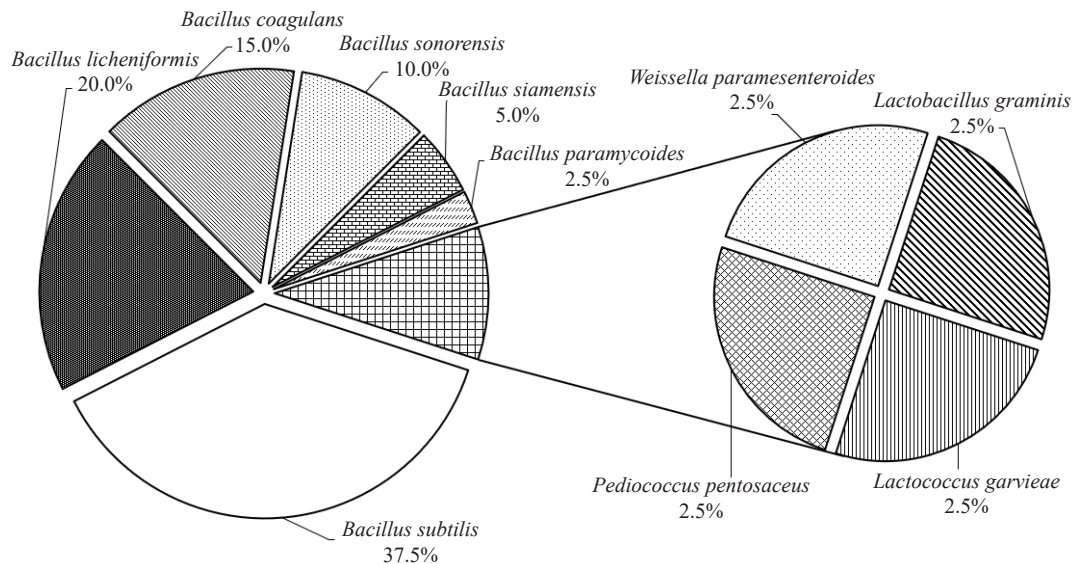


图 5 细菌分离株相对含量分析

Fig.5 Relative abundance analysis of bacterial isolates

vieae)和 *Weissella* 下的类肠膜魏斯氏菌(*W. paramesenteroides*)。本研究进一步对各细菌分离株的类群构成及其相对含量(某一种细菌分离株数量占总分离株数量的百分比)进行了统计,结果如图 5 所示。

由图 5 可知,在高温大曲总分离株中,隶属于 *Bacillus* 的细菌分离菌株相对含量较高为 90%,其中以 *B. subtilis*、*B. licheniformis* 和 *B. coagulans* 这 3 个种为主,其相对含量分别为 37.5%、20.0% 和 15.0%,而隶属于 *Pediococcus*、*Lactobacillus*、*Weissella* 和 *Lactococcus* 的细菌分离株其相对含量均为 2.5%。除此之外,结合 2.2 高通量测序技术对高温大曲中细菌类群结构的解析,*Bacillus* 亦为大曲中的优势细菌属。WU 等^[24]的研究表明,*Bacillus* 为一种常见于大曲中的耐热微生物,其在酿造过程中会分泌多种水解酶,例如淀粉酶、蛋白酶、脂肪酶、纤维素酶和葡聚糖酶等,从而促进大分子物质的水解和风味化合物的产生。通过 MiSeq 测序技术解析发现,兰陵酒业高温大曲中的细菌主要为 *Kroppenstedtia*、*Thermoactinomyces*、*Saccharopolyspora*、*Staphylococcus*、*Rhodococcus*、*Weissella* 和 *Bacillus* 等,但采用纯培养技术分离出的细菌主要为 *Bacillus* 和 *Weissella*,两者结果存在一定的差异。究其原因可能与细菌分离过程中所使用的培养基种类和培养条件较少有关,在后续研究中应进一步使用“培养组学”的方法,通过设置多重培养基和培养条件对大曲中细菌菌株进行分离,进而实现高温大曲中可培养微生物资源的深度挖掘和保护。

2.4 高温大曲各理化指标的分析

理化性质是鉴别大曲品质好坏的重要依据^[18]。本研究首先使用常规检测方法对兰陵酒业 15 份高温大曲的酸度、水分含量、氨基酸态氮、灰分、淀粉含量、蛋白质含量和 5 个力等指标进行了测定分析,其结果如表 1 所示。

表 1 高温大曲各理化指标分析

Table 1 Analysis of physicochemical indexes of high-temperature Daqu

理化指标	平均值	中位值(最小值,最大值)	标准差
酸度(mmol/10 g)	1.20	1.10(1.00, 1.60)	0.20
水分含量(%)	8.59	8.60(8.22, 8.94)	0.21
氨基酸态氮(g/kg)	3.67	3.55(2.76, 4.52)	0.59
灰分(g/100 g)	2.00	2.00(1.83, 2.08)	0.07
淀粉含量(%)	54.57	54.20(50.90, 58.50)	2.73
蛋白质含量(%)	15.72	15.65(15.02, 16.97)	0.50
糖化力(mg/g·h)	257.93	200(7.00, 633.00)	210.22
酯化力(mg/50 g·7 d)	145.93	149(0.00, 412.00)	109.87
发酵力(g/0.5 g·72 h)	0.10	0.07(0.05, 0.26)	0.06
酒化力(% vol)	2.23	0.3(0.00, 7.90)	3.11
液化力(g/g·h)	0.73	0.42(0.13, 4.75)	1.16

由表 1 可知,纳入本研究的高温大曲平均酸度值为 1.20 mmol/10 g,水分含量为 8.59%,氨基酸态氮为 3.67 g/kg,灰分为 2.00 g/100 g,淀粉含量为 54.57%,蛋白质含量为 15.72%,糖化力为 257.93 mg/g·h,酯化力为 145.93 mg/50 g·7d,发酵力为 0.10 g/0.5 g·72 h,酒化力为 2.23%vol 和液化力为 0.73 g/g·h。在测定大曲这 11 项理化指标的过程中,发现其糖化力和酯化力的数值波动较大,标准差分别为 210.22 和 109.87。有研究指出,大曲在开始培养阶段,由于曲房内温度的升高,不耐高温的菌群生长受到抑制导致大曲糖化力下降,随着翻曲步骤的进行,曲房温度有所降低,微生物类群又逐渐生长并推动了大曲糖化力的回升,与此同时,微生物代谢产物的不断积累亦推动了大曲酯化力的上升^[25],由此可推测,大曲在发酵过程中由于堆放位置的不同使得其受温度与面积亦有不同,从而产生了同一批次大曲糖化力和酯化力差异较大的现象。除此之外,大曲酒化力和液化力的数值波动亦较大,最小值分别为 0% vol 和 0.13 g/g·h,最大值分别为 7.90% vol 和 4.75 g/g·h。

究其原因可能在于 *Kroppenstedtia*、*Thermoactinomyces*、*Saccharopolyspora* 和 *Bacillus* 等菌属具有较强的液化力^[25],且结合细菌多样性研究可知这些菌属在高温大曲中均为优势细菌属,然而受到曲块堆放位置的影响其相对含量在各大曲中明显分布不均一,这种现象可导致大曲液化力和酒化力数值出现波动。大曲酸度值的变化主要是由于曲中产酸菌有机酸代谢以及淀粉和蛋白质等降解活动而形成,适宜的酸度可促进有益菌参与酯化反应从而生成香味物质^[26-27]。游离氨基酸是大曲中香气形成的重要前体物质,主要来源于大曲原料中蛋白质的降解^[28]。

2.5 高温大曲中细菌类群与理化因子的相关性分析

有研究表明,大曲中理化特性的变化与微生物密切相关^[18]。因此,本研究在对高温大曲理化指标和细菌类群进行解析的基础上,进一步对两者之间关联性进行了研究,其相关性热图如图 6 所示。

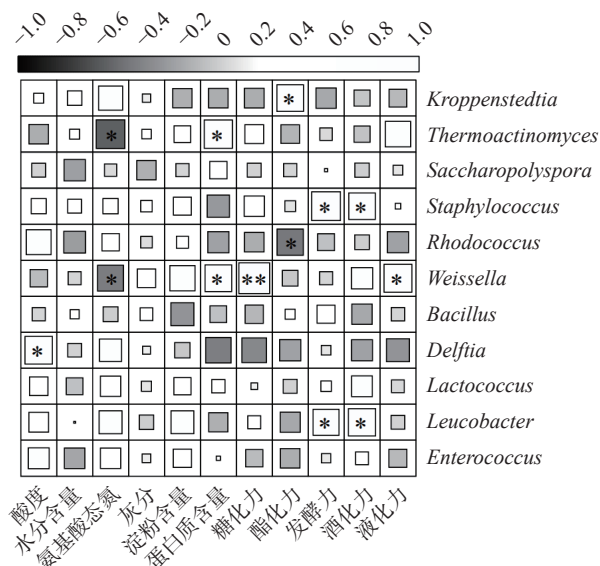


图 6 优势细菌属与理化指标相关性分析

Fig.6 Correlation analysis between dominant bacterial genera and physicochemical indexes

注: *代表 $P < 0.05$, 表示呈现显著相关性; **代表 $P < 0.01$, 表示呈现极显著相关性。

由图 6 可知, 兰陵酒业高温大曲中细菌类群与理化指标间存在着较为复杂的相关关系。*Kroppenstedtia* 与酯化力呈显著正相关($P < 0.05$)。 *Thermoactinomyces* 与氨基酸态氮呈显著负相关($P < 0.05$), 与蛋白质含量呈显著正相关($P < 0.05$)。 *Staphylococcus* 和 *Leucobacter* 均与发酵力和酒化力呈显著正相关($P < 0.05$)。 *Rhodococcus* 与酯化力呈显著负相关($P < 0.05$)。 *Weissella* 与氨基酸态氮呈显著负相关($P < 0.05$), 与蛋白质含量和液化力均呈显著正相关($P < 0.05$), 与糖化力呈极显著正相关($P < 0.01$)。 *Delftia* 与酸度呈显著正相关($P < 0.05$)。有研究指出, 糖化力与糖化酶有关, 酯化力与酯化酶有关, 液化力与液化型淀粉酶有关等^[29]。由此可见, 不同细菌类群在生长代谢过程中可产生大量不同的活性酶系及

代谢产物, 其群落间的共同作用在一定程度上决定了大曲的理化品质。值得一提的是, 有研究指出 *Bacillus* 与大曲糖化力和液化力均呈现显著相关性^[30], 然而这一结论在本研究中并未得到验证。究其原因可能在于两个方面, 一是本研究仅采集了兰陵酒业的 15 个酒曲样品, 样品数量相对不足且地域相对集中; 二是由于检测是基于核苷酸序列进行的, 因而 MiSeq 高通量测序技术的检测结果包含了酒曲中具有活性、处于休眠和死亡状态的菌株, 因而本研究得出的结论可能与基于纯培养技术得出的结论存在一定的差异。由此可见, 在后续研究中通过设置多个采样点并增加样本的采集量, 同时在采用纯培养技术对大曲中的芽孢杆菌类群进行分离鉴定的基础上进一步解析其与酒曲糖化力和液化力的关联性, 对于本研究结果的验证和巩固是极为必要的。

3 结论

本研究对兰陵酒业 15 份高温大曲的细菌类群和理化特性均进行了测定分析, 结果发现, 大曲中蕴含着大量细菌类群, 其主要隶属于 *Kroppenstedtia*、*Thermoactinomyces*、*Saccharopolyspora*、*Staphylococcus*、*Rhodococcus*、*Weissella*、*Bacillus*、*Delftia*、*Lactococcus*、*Leucobacter* 和 *Enterococcus*, 基于纯培养技术发现 *B. subtilis*、*B. licheniformis* 和 *B. coagulans* 为可培养优势细菌分离株。大曲间糖化力、酯化力、酒化力和液化力这 4 个指标的差异较大, 酸度、水分含量、氨基酸态氮和灰分等 7 个理化指标的差异较小, 同时 *Kroppenstedtia*、*Thermoactinomyces*、*Staphylococcus*、*Leucobacter*、*Rhodococcus*、*Weissella* 和 *Delftia* 与各理化指标间存在着较为复杂的相关关系, 进一步为后续临沂地区酿酒微生物资源的挖掘和大曲品质变化的机理提供了理论依据和数据支撑。同时, 基于可培养菌株与优势细菌属间种属的差异, 在后续研究中将进一步通过设置多个采样点并增加样本的采集量, 使用“培养组学”的方法对大曲中细菌菌株进行分离, 可能会使得后续大曲中优势细菌菌株的分离更具有针对性。

© The Author(s) 2024. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

参考文献

- [1] DU H, WANG X, ZHANG Y, 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 (5): 32-40.
- [2] 王颖, 邱勇, 王隆, 等. 不同产区酱香型高温大曲黑、白、黄曲的理化、挥发性成分差异性分析[J]. 中国调味品, 2022, 47(6): 155-159. [WANG Y, QIU Y, WANG L, et al. Analysis on the differences of physicochemical indexes and volatile components of black, white and yellow Koji at high temperature with Maotai flavor

- in different production areas[J]. *China Condiment*, 2022, 47(6): 155–159.]
- [3] XIE M, LÜ F, MA G, et al. High throughput sequencing of the bacterial composition and dynamic succession in Daqu for Chinese sesame flavour liquor[J]. *Journal of the Institute of Brewing*, 2020, 126(1): 98–104.
- [4] YANG J G, DOU X, MA Y Y. Diversity and dynamic succession of microorganisms during Daqu preparation for Luzhou-flavour liquor using second-generation sequencing technology[J]. *Journal of the Institute of Brewing*, 2018, 124(4): 498–507.
- [5] LIU Y, LI X, LI H, et al. Taorong-type Baijiu starter: Analysis of fungal community and metabolic characteristics of middle-temperature Daqu and high-temperature Daqu[J]. *PLoS One*, 2022, 17(10): e0274881.
- [6] 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(12): 110734.
- [7] 何猛超, 任义平, 熊林, 等. 茅台地区不同高温大曲微生物群落结构解析[J]. *中国酿造*, 2022, 41(6): 51–57. [HE M C, REN Y P, XIONG L, et al. Microbial community structure of different high-temperature Daqu in Maotai area[J]. *China Brewing*, 2022, 41(6): 51–57.]
- [8] WANG Y, CAI W, WANG W, et al. Analysis of microbial diversity and functional differences in different types of high - temperature Daqu[J]. *Food Science & Nutrition*, 2021, 9(2): 1003–1016.
- [9] LIU P, ZHANG L, DU X, 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): 287–294.
- [10] WEI Z G, ZHANG X D, CAO M, et al. Comparison of methods for picking the operational taxonomic units from amplicon sequences[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2021, 12(3): 644012.
- [11] MIODUCHOWSKA M, NITKIEWICZ B, ROSZKOWSKA M, et al. Taxonomic classification of the bacterial endosymbiont *Wolbachia* based on next-generation sequencing: Is there molecular evidence for its presence in tardigrades?[J]. *Genome*, 2021, 64(10): 951–958.
- [12] BRANDT M I, TROUCHE B, QUINTRIC L, et al. Bioinformatic pipelines combining denoising and clustering tools allow for more comprehensive prokaryotic and eukaryotic metabarcoding[J]. *Molecular Ecology Resources*, 2021, 21(6): 1904–1921.
- [13] ROBESON M S, O'ROURKE D R, KAEHLER B D, et al. RESCRIPT: Reproducible sequence taxonomy reference database management[J]. *PLoS Computational Biology*, 2021, 17(11): e1009581.
- [14] 倪慧, 王强, 魏冰倩, 等. 恩施市泡萝卜中乳酸菌的分离鉴定及其对品质的影响[J]. *食品工业科技*, 2019, 40(17): 64–68, 78. [NI H, WANG Q, WEI B Q, et al. Isolation and identification of lactic acid bacteria from pickled radish in Enshi and its effects on quality[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2019, 40(17): 64–68, 78.]
- [15] RIZVI N B, ALEEM S, KHAN M R, et al. Quantitative estimation of protein in sprouts of *Vigna radiate* (Mung Beans), *Lens culinaris* (Lentils), and *Cicer arietinum* (Chickpeas) by Kjeldahl and Lowry methods[J]. *Molecules*, 2022, 27(3): 814.
- [16] 孙羊羊, 尹亚格, 吴雨麓, 等. 基于高通量测序技术分析天津高温大曲微生物菌群多样性[J]. *中国酿造*, 2023, 42(5): 28–34. [SUN Y Y, YIN Y G, WU Y M, et al. Analysis of microbial community diversity of Tianjin high-temperature Daqu based on high-throughput sequencing technology[J]. *China Brewing*, 2023, 42(5): 28–34.]
- [17] 何猛超, 罗家顺, 罗轲, 等. 基于高通量技术对比分析南洲大曲与茅台大曲的细菌多样性[J]. *酿酒科技*, 2022, 43(10): 17–21. [HE M C, LUO J S, LUO K, et al. Comparative analysis of bacterial diversity between Nanzhou Daqu and Maotai Daqu based on high-throughput sequencing[J]. *Liquor-Making Science & Technology*, 2022, 43(10): 17–21.]
- [18] 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(7): 1540.
- [19] DENG L, MAO X, LIU D, et al. Comparative analysis of physicochemical properties and microbial composition in high-temperature Daqu with different colors[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2020, 11(11): 588117.
- [20] 胡宝东, 王晓丹, 王婧, 等. 酱香型大曲生产工艺与大曲品质的关系研究[J]. *食品工业*, 2016, 37(2): 260–264. [HU B D, WANG X D, WANG J, et al. Relationship between production technology of Maotai-flavor Daqu and its quality[J]. *The Food Industry*, 2016, 37(2): 260–264.]
- [21] 周金虎, 李良, 方尚玲, 等. 窖泥中高产愈创木酚类功能菌的筛选与鉴定[J]. *食品与发酵工业*, 2019, 45(3): 64–70. [ZHOU J H, LI L, FANG S L, et al. Screening and identification of functional boacteria with high yield guaiacol in the mud[J]. *Food and Fermentation Industries*, 2019, 45(3): 64–70.]
- [22] LIU P, MIAO L. Multiple batches of fermentation promote the formation of functional microbiota in Chinese miscellaneous-flavor Baijiu fermentation[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2020, 11(1): 75.
- [23] 母应春, 姜丽, 苏伟. 应用 Illumina 高通量测序技术分析 3 种酒曲中微生物多样性[J]. *食品科学*, 2019, 40(14): 115–122. [MU Y C, JIANG L, SU W. Analysis of microbial diversity in three rice wine Kojis by Illumina high-throughput sequencing[J]. *Food Science*, 2019, 40(14): 115–122.]
- [24] WU X, JING R, CHEN W, et al. High-throughput sequencing of the microbial diversity of roasted-sesame-like flavored Daqu with different characteristics[J]. *3 Biotech*, 2020, 10(11): 1–11.
- [25] 曹敬华, 李恬心, 刘雄锋, 等. 不同工艺高温大曲的理化指标变化趋势研究[J]. *食品科技*, 2023, 48(3): 102–109. [CAO J H, LI T X, LIU X F, et al. The changing trend of physical and chemical indexes of high-temperature Daqu with different processes[J]. *Food Science and Technology*, 2023, 48(3): 102–109.]
- [26] 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, 44(5): 70–77. [ZHANG R, LIU W H, ZHANG L Q, et al. Analysis of microbial community and functional heterogeneity of high-temperature Daqu based on metagenomics[J]. *Liquor-Making Science & Technology*, 2023, 44(5): 70–77.]
- [27] 周斐成, 吴生文, 朱庆圣, 等. 特香型大曲发酵过程中曲块不

同部位理化指标及主要酶系动态分析[J]. [中国酿造](#), 2019, 38(4): 58–64. [ZHOU F C, WU S W, ZHU Q S, et al. Physicochemical indexes and dynamic analysis of main enzymes in different layers of Te-flavor Daqu during fermentation process[J]. [China Brewing](#), 2019, 38(4): 58–64.]

[28] 彭璐, 明红梅, 董异, 等. 不同曲层中高温大曲质量差异性研究[J]. [食品与发酵工业](#), 2020, 46(3): 58–64. [PENG L, MING H M, DONG Y, et al. Study on the quality of medium-high temperature Daqu in different curved layers[J]. [Food and Fermentation Industries](#), 2020, 46(3): 58–64.]

[29] 张艳, 曹丹, 孟勤燕, 等. 凤型大曲储藏期不同部位理化指标及微生物群落演替规律分析[J]. [酿酒科技](#), 2022, 43(12): 57–64.

[ZHANG Y, CAO D, MENG Q Y, et al. Analysis of physicochemical indexes and microbial community succession of Fengxiang Daqu during storage period[J]. [Liquor-Making Science & Technology](#), 2022, 43(12): 57–64.]

[30] WU X, JIANG Q, WANG Z, 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.