

研究报告

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

梁晨 杜海 徐岩*

(工业生物技术教育部重点实验室 江南大学酿酒科学与酶技术中心 江苏 无锡 214122)

摘要:【目的】研究大曲贮存过程中原核微生物群落结构及风味成分变化规律, 阐述大曲贮存阶段的必要性和重要性, 并探索不同微生物种属之间的相互关系, 为更好地控制大曲品质提供微生物和风味方面的参考依据。【方法】通过 MiSeq 高通量测序剖析大曲成熟过程中原核微生物群落结构变化; 利用共存(Co-occurrence)模式方法分析不同种属微生物之间的相关关系, 预测其相关性; 利用 SPME-GC-MS 分析贮存过程中大曲风味成分的变化规律。【结果】采用 MiSeq 测序方法共得到 3 710 个 OTUs, 除不能有效比对的序列外共鉴定出 29 个门和 160 个种属。其中, 乳杆菌属、芽孢杆菌属、明串珠菌属、高温放线菌属、乳球菌属等是大曲中的优势菌群。随大曲贮存时间推移, 贮存前期不断积累酸、醇类物质, 后期酯类及含氮类等重要风味物质不断形成, 而 4-甲基苯酚等异味物质的含量却不断降低。相关性分析结果表明, 乳酸菌与乳酸、乙酸等酸类物质之间存在显著的相关性, 芽孢杆菌与酸类及含氮化合物之间存在显著的相关性。【结论】大曲贮存过程中, 原核微生物结构不断发生调整, 风味物质向更优质白酒风味进行变化。除环境因素外, 原核微生物的代谢活动对风味物质的形成具有重要的影响, 因此大曲贮存是白酒酿造过程中必不可少的环节。

关键词: 大曲, 贮存, 原核微生物群落结构, 共存关系, 风味成分

Foundation item: National High-Tech Research and Development Program of China (863 Program) (No. 2013AA102108); National Natural Science Foundation of China (No. 31530055, 31501469); Natural Science Foundation of Jiangsu Province (No. BK20150143); Program of Introducing Talents of Discipline to Universities (111 Project) (No. 111-2-06); Fundamental Research Funds for the Central Universities (No. JUSRP11537); The '3C' Plan of Chinese Liquor

***Corresponding author:** Tel: 86-510-85918201; E-mail: yxu@jiangnan.edu.cn

Received: February 24, 2016; **Accepted:** April 21, 2016; **Published online** (www.cnki.net): May 03, 2016

基金项目: 国家高技术研究发展计划(863 计划)项目(No. 2013AA102108); 国家自然科学基金项目(No. 31530055, 31501469); 江苏省自然科学基金项目(No. BK20150143); 学科人才引进计划项目(111 计划) (No. 111-2-06); 中央高校基本科研基金项目(No. JUSRP11537); 中国白酒“3C”计划项目

***通讯作者:** Tel: 86-510-85918201; E-mail: yxu@jiangnan.edu.cn

收稿日期: 2016-02-24; **接受日期:** 2016-04-21; **优先数字出版日期**(www.cnki.net): 2016-05-03

The succession of procaryotic microbial community and the flavor components in the storage process of *Daqu*

LIANG Chen DU Hai XU Yan*

(Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, School of Biotechnology, Jiangnan University, Center for Brewing Science and Enzyme Technology, Wuxi, Jiangsu 214122, China)

Abstract: [Objective] To expound the necessity and importance of the storage process of *Daqu*, and to control the quality of *Daqu*, we researched the succession of bacterial community and the flavor components of *Daqu*. The relationships between different bacterial genera were also analyzed. [Methods] We analyzed the bacterial community structure of *Daqu* in different storage processes through MiSeq high-throughput sequencing technology; Co-occurrence pattern analysis method was used to analyze the relationships between different genera of bacteria; SPME-GC-MS was used to analyze the flavor compounds of *Daqu* in different storage processes. [Results] 3 710 OTUs were obtained through MiSeq technology, which classified to 160 genera, 29 phyla. *Lactobacillus*, *Bacillus*, *Leuconostoc*, *Thermoactinomyces* and *Lactococcus* were the dominant genera in *Daqu*, which is the guarantee for the normal fermentation. During the storage process, acids, alcohols, esters and other components which good for the flavor of *Chinese liquor* were accumulated, while the off-odor compounds such as 4-methyl phenol were constantly reduced. The significant pairwise linear regressions for bacteria and flavor components indicated that lactic acid bacteria was closely correlated to lactic acid, acetic acid and other acid components. Besides acids components, *Bacillus* was correlated to nitrogen compounds also. [Conclusion] During the storage process, the bacterial community structure of *Daqu* was adjusted and the flavor components were changed for better flavor. In addition to the environmental factors, the metabolic activity of bacteria is the main influence of the formation of flavor components. Therefore, the storage of *Daqu* is necessary.

Keywords: *Daqu*, Storage, Procaryotic microbial community, Co-occurrence, Flavor component

大曲是以单一小麦或小麦、大麦和豌豆混合物为原料,经粗粉碎后加水压成砖状曲坯,人工控制在一定的温度、湿度条件下培育而成的粗酶制剂。大曲在白酒酿造中有着举足轻重的作用,其中栖息着大量微生物种属(如细菌、霉菌及酵母等)^[1],而微生物是决定大曲品质的核心因素。研究表明,大曲不仅是糖化剂和发酵剂,也是酿造原料的一部分,其所含大量风味物质或其前体物质在酿造过程中直接或间接地进入酒体,对中国白酒的香型、风格和流派有着深远的影响。大曲在制作结束后要经过贮存才可投入生产,一般贮存时间为3–6个月^[2]。贮存时间的长短不仅影响生产的进度,更影响大曲的品质,进而影响白酒的品质。但目前针对贮存在制曲过程中的作用并未见科学解释。实际生产中主要依靠生产经验判断大曲是否已经成熟(贮存到一定时间),存在着盲目性和不确定性,对后续的生产

造成不可预知的影响。因此,判断大曲贮存阶段的终点是白酒酿造工艺中的重要环节,也是目前亟待解决的问题。本研究将从微生物和风味两个角度解析大曲贮存过程中的变化规律,为大曲贮存的必要性和判断合理的贮存时间提供一定的科学依据。

综合大曲微生物研究现状可知,研究手段从传统微生物可培养研究方法逐渐向未培养等分子生物学技术过渡。20世纪80年代后期,随着对传统固态发酵白酒的再认识,大曲微生物的研究逐渐进入高潮^[3]。王忠彦等^[4]、施安辉等^[5]、廖建民等^[6]利用传统可培养方法对大曲中的微生物进行了探索和研究,揭示了大曲微生物优势菌群的种属分布,得到的微生物分为霉菌、细菌、酵母菌等,促进了制曲技术的发展。但研究方法本身的缺陷导致无法全面地认识大曲中的微生物。变性凝胶梯度电泳(PCR-denaturing gradient gel electrophoresis,

PCR-DGGE)技术于 21 世纪初运用到大曲微生物的研究中,使人们可以更进一步认识大曲中的微生物。Chen 等^[7]将 PCR-DGGE 技术应用到制曲过程中微生物群落结构的检测,结果表明枯草杆菌和米曲霉是优势菌群。利用 PCR-DGGE 法研究大曲微生物,能够提供群落中优势种类信息,并同时分析多个样品,但实验操作繁琐,对微生物多样性的认识有限^[8]。随着高通量测序等新技术的不断更新,二代测序技术被大规模地应用到微生物生态学的研究。Zhang 等^[9]利用二代测序技术,分析了清香型三种大曲(清茬、后火、红心)的不同微生物结构,为生产时大曲的添加比例提供了可靠依据。大曲作为糖化和发酵剂^[10],糖化力和发酵力是其重要指标^[11],与之相关的关键酶及其微生物更是研究的热点。因此针对大曲中霉菌和酵母的研究较多^[12-13],原核微生物的研究相对较少。而大曲中的原核微生物种类繁多,是发酵产香的主要动力^[14-16],但原核微生物与风味物质之间对应的相关性尚不明确,即每种微生物与哪种或哪些风味物质相关目前还不得而知,因此研究原核微生物与风味物质之间的相关性可以为生产优质白酒提供理论依据。MiSeq 测序系统采用 Illumina 成熟的边合成边测序技术,其针对原核微生物的分析更为成熟,数据库更为全面,因此大曲原核微生物群落结构是本研究对象。此外,大曲微生物之间是存在正相关的共生关系,还是负相关的拮抗关系,这方面研究鲜有报道。

本研究将高通量测序技术应用到大曲微生物的研究中,以期更全面地解析大曲中微生物群落结构和动态演替规律。由于大多数原核微生物生长条件不明确,很多类群目前还无法培养,应用 MiSeq 测序技术将有助于更多地了解大曲中的原核微生物群落结构。同时,将共存(Co-occurrence)模式分析法应用到大曲中微生物间的相互作用关系研究,以揭示大曲微生物间潜在的相互作用关系,为强化大曲功能微生物的研究奠定基础。与此同时,结合大曲风味成分的研究,将有助于加强对酒曲风味物质形成机理的认识和理解,进一步阐明大曲贮存过

程的科学性及必要性。

1 材料与方法

1.1 曲样

样品取自某酒厂高温大曲,按贮存 0、1、2、3、4、5 和 6 个月共 7 个时间点分别采集大曲样品。为保证取样的科学性及均一性,每个贮存时间点随机选取 3 块曲构成 3 个平行样,将大曲粉碎后各取 20 g 混合成一个样本,置于-20 °C 保藏待用。

1.2 药品及试剂

磷酸氢二钠、磷酸二氢钠、醋酸钠、无水氯化钙、氯化钠、三氯乙酸、10 mmol/L Tris-HCl (pH 8.0)、饱和酚溶液、氯仿、异戊醇、无水乙醇、10% SDS (pH 8.0)购自国药集团化学试剂(北京)有限公司;用于 GC-MS 的乙醇、薄荷醇均为色谱级,购自 Sigma 公司。

1.3 主要仪器

高速冷冻离心机,Beckman Coulter 公司;Beadbeater 细胞破碎仪,BioSpec 公司;制冰机,斯科茨曼制冰系统有限公司;Milli-Q 超纯水系统,Millipore 公司;电热恒温水浴锅,上海华连医疗器械有限公司;NanoDrop ND-1000 UV-Vis 紫外分光光度计,Thermo 公司;电泳仪,Bio-Rad 公司;冷冻真空干燥器,Labconco 公司;pH 计,Mettler-Toledo 公司;超声波清洗仪,Elma 公司;气象色谱质谱联用仪 GC 6890N-MSD 5975,Agilent 公司。

1.4 实验方法

1.4.1 宏基因组提取及 MiSeq 测序: (1) 样品前处理。准确称取 7 g 大曲样品于装有 20 mL 无菌的 0.1 mol/L 的 PBS 缓冲液(0.057 7 mol/L Na₂HPO₄, 0.042 3 mol/L NaH₂PO₄)中,加入玻璃珠漩涡振荡 3 min 充分混匀。300×g 离心 5 min,收集上清液。用 PBS 缓冲液重复洗涤沉淀 3 次,收集 3 次上清液转至无菌的离心管中。将收集的上清液 10 000×g 离心 15 min,收集细胞沉淀。用 5 mL PBS 缓冲液重复洗涤细胞沉淀 3 次,直至洗液干净无色,再 10 000×g 离心 10 min 重新收集细胞沉淀。

(2) 宏基因组 DNA 的提取。样品 DNA 提取参照文献^[17],用酚、氯仿进行提取,经真空冷冻干

燥后溶于 50 μL 无菌水, $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

(3) PCR 扩增、纯化及定量。利用引物对 515F (5'-GTGCCAGCMGCCGCGGTAA-3')和 806R 融合引物 (5'-NNNNNNNNNNNNNGGACTACHVGGGT WTCTAAT-3', N 为 Barcode 序列碱基)对上述大曲基因组进行 PCR 扩增,该引物对针对细菌和古细菌 16S rRNA 基因序列中的 V4 可变区进行扩增^[18]。扩增体系(50 μL): $1\times\text{PCR}$ 缓冲液(Mg^{2+}), 0.2 mmol/L dNTPs, 0.4 mmol/L 前引物, 0.4 mmol/L 后引物, 1.25 U TaKaRa *Taq* HS polymerase 聚合酶, 10 ng 样品基因组 DNA 模板。扩增条件: $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ 5 min; $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ 30 s, $55\text{ }^{\circ}\text{C}$ 30 s, $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 45 s, 共 32 个循环; $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 5 min。对每个样品的基因组 PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳分析。用 Gel DNA Purification Kit 试剂盒对 DNA 条带进行切胶纯化回收。纯化后的 PCR 产物用 NanoDrop[®] ND-1000 UV-Vis 紫外分光光度计进行定量,然后不同样品的 PCR 产物以等分子量进行混合。

(4) Illumina MiSeq 测序及序列分析。将合并的 PCR 产物按照说明书 TruSeq[®] DNA Sample Preparation Guide 中的 Low Sample (LS) Protocol 进行文库制备,在 Illumina 平台上进行双端测序 (2 \times 250 bp)。然后将所得原始序列按照 Ren 等^[19]的方法进行序列质量控制处理最终得到有效序列。本实验用 QIIME's uclust 程序将相似度为 97%有效序列归为一个 OTU (可操作单元, Operational taxonomic unit, 这里指种属)并确定每个 OTU 的代表序列。利用 QIIME pipeline 软件计算大曲微生物

群落的 α -多样性信息,包括 Shannon 及 Chao1 指数。基于 Weighted UniFrac 距离对不同大曲样品中微生物群落进行主坐标轴分析(PcoA)。将每个 OTU 的代表序列与 Ribosomal Database Project (RDP)在线数据库进行比对,选取置信度为 80%的阈值对上述序列进行分类,进而得到每个 OTU 的分类水平,即门、纲、目、科及属水平。

1.4.2 大曲风味物质检测方法: 使用 SPME-GC-MS 检测大曲中挥发性风味物质的含量,方法参照参考文献[20],使用浓度为 100 mg/L 的薄荷醇作为内标。

1.4.3 大曲微生物共存性(Co-occurrence)分析: 研究通过网络分析考查大曲中微生物之间的同现性,方法参照参考文献[21]。首先对大曲样品中鉴定到已知属的微生物进行 Spearman 相关性分析,选择计算结果中 Spearman 秩相关系数 $\rho>0.6$ 且显著性水平 $P<0.01$ 的属用于同现网络分析,最后通过 Gephi 软件进行可视化网络制作。

2 结果与讨论

2.1 通过高通量测序分析大曲微生物多样性

为了更全面地揭示大曲微生物群落组成及多样性信息,采用了 Illumina MiSeq 技术对不同贮存时间大曲样品的原核微生物群落进行了解析。图 1A 为样品多样性稀释曲线,已达饱和稳定状态;图 1B 为可观测物种稀释曲线,趋于平缓,且每个样品优质序列覆盖率均超过 98%,因此测序结果能较好地覆盖样品中应有物种信息。

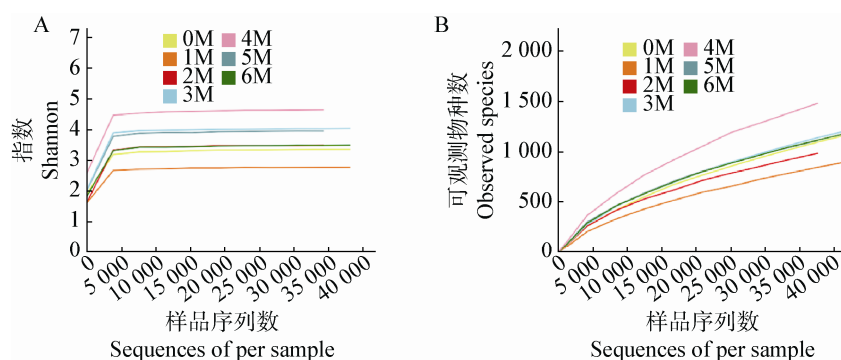


图 1 不同贮存时间大曲样品稀释曲线

Figure 1 Rarefaction curve of *Daqu* in different storage time

注: 图中 0M、1M、2M、3M、4M、5M 及 6M 分别指贮存 0、1、2、3、4、5 和 6 个月的大曲样品。

Note: 0M, 1M, 2M, 3M, 4M, 5M and 6M is indicated for the sample which stored for 0, 1, 2, 3, 4, 5 and 6 months respectively.

通过高通量测序共得到 265 818 条有效序列, 平均每个样品含有 37 974 条序列, 97%水平下共得到 3 710 个 OTUs。分别统计了各个样品的 Chao1 和 Shannon 指数。表 1 为 97%相似度水平下各样品的多样性指数。结果显示, 随贮存时间推移, 大曲样品微生物多样性先上升后稍有下降。在贮存 4 个月时, 多样性指数(Shannon :4.65)及物种丰度指数(Chao 1 : 2 658.48)均达最高值, 之后多样性略有降低。该结果与汤有宏等^[22]研究结果一致, 表明大曲贮存过程中的原核微生物群落结构不断调整、平衡以至稳定。

2.2 大曲贮存过程中原核微生物群落结构演替规律

测序分析结果显示, 不同贮存时间的大曲具有不同的微生物群落结构。3 710 个 OTUs 除不能有效比对的序列外, 共鉴定出 29 个门 160 个属的原核微生物。针对不同贮存时间大曲原核微生物门水平的构成进行了分析。大曲中相对丰度前 10 位菌门依次为: 变形菌门(Proteobacteria)为 55.84%, 厚壁菌门(Firmicutes)为 38.31%, 广古菌门(Euryarchaeota)为 2.02%, 拟杆菌门(Bacteroidetes)为 1.87%, 放线菌门(Actinobacteria)为 0.91%, 蓝菌门(Cyanobacteria)为 0.38%, 互养菌门(Synergistetes)为 0.21%, 绿弯菌门(Chloroflexi)为 0.18%, 泉古菌门(Crenarchaeota)为 0.16%, 酸杆菌门(Acidobacteria)为 0.12%。后续对不同贮存时间的大曲样本相关原核微生物门水平的构成情况进行了分析, 基于相对

丰度在前 14 位的菌门, 构建了每个样本门水平的物种相对丰度柱形图(图 2A), 可见大部分样本的原核微生物群落中, 变形菌门丰度比例最高, 厚壁菌门其次, 且每个样本在门水平具有各自的分布特征。随后对不同贮存时间大曲样品在属水平上的原核微生物结构做了分析(图 2B), 由于变形菌门中多数菌属不能有效比对到属水平, 因此能分析的原核微生物种属大多为厚壁菌门。

从图 2B 中可以看到随贮存时间推移, 大曲样品原核微生物群落结构发生变化: 其中高温放线菌属(*Thermoactinomyces*)逐渐减少; 乳杆菌属(*Lactobacillus*)相对含量逐渐增加后维持不变; 芽孢杆菌属(*Bacillus*)相对含量先增加, 贮存 4 个月后相对含量稍有下降; 明串珠菌属(*Leuconostoc*)相对含量一直处于增加趋势。高温放线菌是高温淀粉酶筛选的主要来源之一^[23], 富含的高温淀粉酶有助于高粱等酿酒原料中淀粉的液化和糖化, 提高原料利用率。高温放线菌还具有较高的脱氢酶、多酚氧化酶和脲酶活性, 是食物残渣转化成成熟堆肥较为理想的菌种之一。在白酒发酵过程, 乳酸菌具有促进美拉德反应、促进酿酒的发酵、维护与保持酿酒微生态环境等作用。乳酸菌的主要代谢产物——乳酸是形成乳酸乙酯及其他香味成分的重要基础物质。乳酸可降低白酒刺激感、增加酒体的浓厚度、延长白酒后味, 同时还可以增加酒体的回甜感, 对丰富白酒风味有作用, 在固态法白酒生产上有着独特的地位^[24]。

表 1 基于 MiSeq 测序不同贮存阶段大曲原核微生物群落多样性分析
Table 1 Analysis of procaryotic microbial community diversity of *Daqu* in different storage time based on MiSeq sequencing

样品编号 Sample No.	有效序列 Effective reads	OTUs	Chao 1	Shannon
0M	38 254	1 043	1 917.63	3.50
1M	38 140	904	1 819.00	2.78
2M	37 761	1 182	2 172.50	3.66
3M	38 231	1 213	2 291.75	4.04
4M	37 468	1 554	2 658.48	4.65
5M	37 783	1 172	2 010.07	3.96
6M	38 181	975	1 751.33	3.56

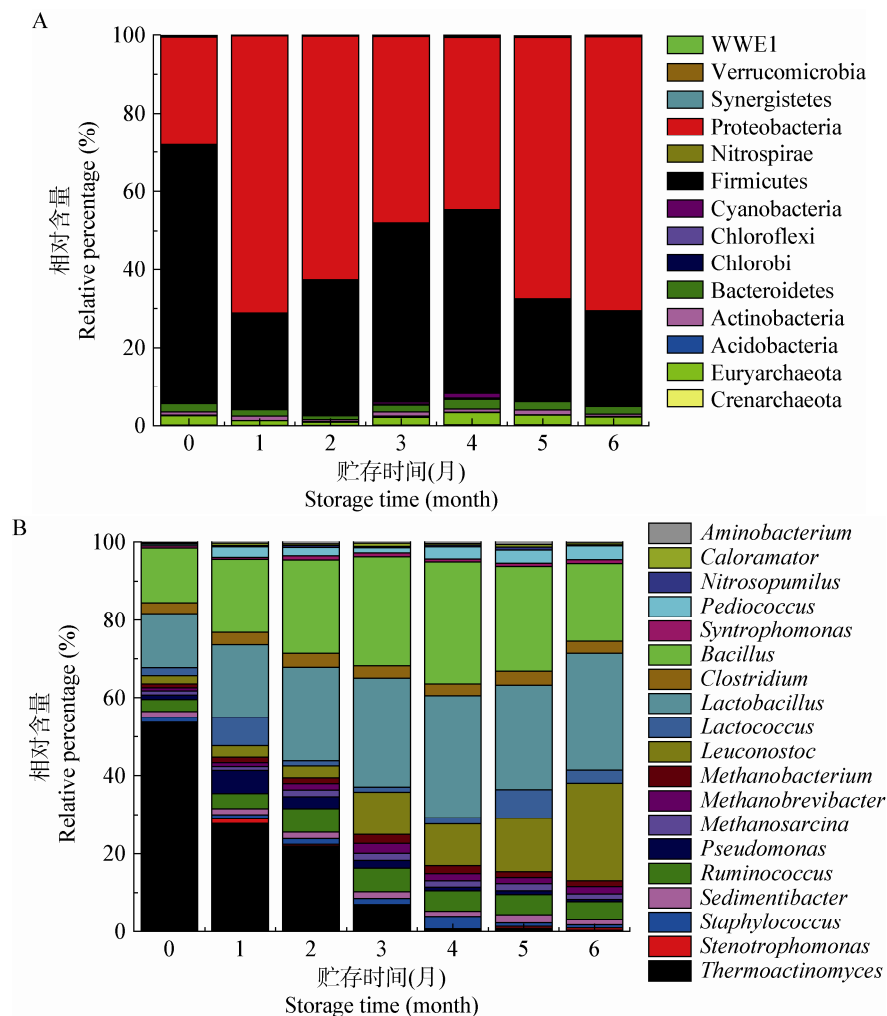


图2 不同贮存时间大曲门水平(A)以及属水平(B)微生物群落结构

Figure 2 Abundance of procaryotic microbial community of *Daqu* in different storage time

乳杆菌属是发酵中后期的绝对优势菌属,是乳酸的主要产生菌属^[25],在发酵中有着举足轻重的作用。明串珠菌属可利用葡萄糖进行异型乳酸发酵产生D型乳酸和醋酸,两者分别为白酒中重要风味成分——乳酸乙酯和乙酸乙酯的前体物质。芽孢杆菌属可利用蛋白质、糖及淀粉,其通过自身的代谢活动对大曲内营养成分的含量产生影响,分泌的胞外蛋白酶使大曲内游离氨基酸总含量增加,尤其是带有苯环的芳香族氨基酸的含量^[26],芽孢杆菌属是大曲中必不可少的细菌,但随贮存时间延长,大曲水分流失,其相对含量略有减少^[27]。

图3为不同贮存时间大曲样品原核微生物群落

的PCoA分析,结果显示了不同大曲样品微生物群落结构上的区别。从图3中可以看到,不同大曲样品分布于4个象限,其中贮存0月(刚进房贮存的大曲)的样品单独位于第一象限,表明它的微生物群落结构与其它贮存时间段样品差异较大。贮存1、2个月的样品被聚类到一起,位于第3象限。贮存3、4和5个月的大曲样品同时分布于第4象限,其中贮存3个月和4个月两个样品被聚类到一起,两者微生物多样性及组成结构相近。贮存6个月的大曲样品单独位于第2象限,但其与贮存5个月的大曲样品微生物群落结构相近。随大曲贮存时间的推移,能明显看到大曲中原核微生物群落结构的

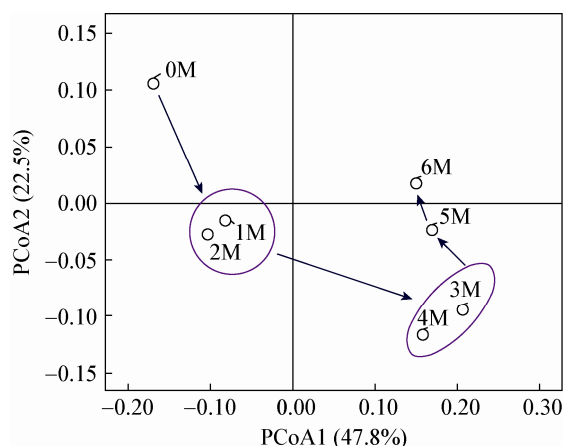


图3 不同贮存时间大曲样品原核微生物群落 PCoA 分析
Figure 3 PCoA based on the unweighted UniFrac analysis showing the procaryotic microbial community grouping

变化,可以分为4个阶段:(1)刚进房的大曲,品温高,含水量大,其中嗜热微生物居多;(2)贮存1-2个月的大曲,温度和水分下降较快,微生物多样性提高,微生物结构迅速调整;(3)贮存3-4个月的大曲,品温和水分趋于稳定,乳酸菌等发酵阶段的主要微生物相对含量增加;(4)贮存5个月及以后的大曲,微生物多样性略有降低,群落结构趋于稳定。

2.3 微生物同现分析

根据高通量测序结果可知大曲中含有复杂的微生物群落,这些微生物之间通过共生、竞争及拮抗等关系相互影响形成一个相对稳定的微生物群落。传统可培养方法只能研究几株菌之间的相互关系,且需耗费大量人力、物力,用于研究大量不同种属之间的相关性显然不合适。根据最近的报道,网络分析法使深入挖掘环境中复杂的微生物群落成员之间相关性成为可能,并且广泛应用在土壤、海洋及活性污泥中微生物相互作用关系的研究^[28-30]。图4为大曲微生物整体相关关系网络分析图,图中不同颜色圆圈代表不同门分类水平,圆圈大小反映与之关联的节点数(相关菌属)多少,圆圈越大,与之关联菌属越多。线的粗细反映相关性强弱,线越粗,相关性越强,蓝色线表明呈正相关关系,红色

线表明呈负相关关系。图4显示,乳杆菌属(*Lactobacillus*)与互营单胞菌属(*Syntrophomonas*)、棒杆菌属(*Corynebacterium*)及瘤胃球菌属(*Ruminococcus*)呈强正相关关系,与梭菌属(*Clostridium*)及喜热菌属(*Caloramator*)正相关性较弱,其中瘤胃球菌属与互营单胞菌属呈强正相关性关系。链球菌属(*Streptococcus*)与醋菌属(*Acetobacter*)及香味菌属(*Myroides*)两两互为强正相关关系。片球菌属(*Pediococcus*)与糖多孢菌属(*Saccharopolyspora*)呈强正相关关系,乳球菌属(*Lactococcus*)与寡养单胞菌属(*Stenotrophomonas*)呈强正相关关系。芽孢杆菌属(*Bacillus*)与脱硫叶菌属(*Desulfobulbus*)之间,魏斯氏菌属(*Weissella*)与香味菌属及假单胞菌属(*Pseudomonas*)之间呈强负相关关系等。虽然从现有的结果中很难分析出微生物种属之间关系的内在原因,但是图4中列出的菌属之间的相关关系指明了潜在的菌属相互作用,为进一步研究菌种之间的相互作用提供依据。就目前结果来看,乳杆菌属不仅是绝对的优势菌属,更与多种菌属之间存在相关性,可以作为后续研究的重点微生物。

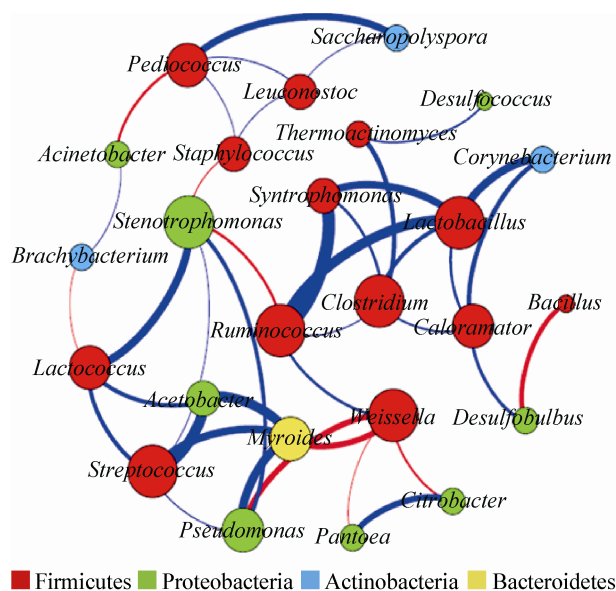


图4 贮存过程中大曲原核微生物同现性网络分析
Figure 4 Network of co-occurring procaryotic microflora in Daqu based on correlation analysis

2.4 大曲贮存过程中风味演变规律

在大曲样品中共定性检出了 50 种挥发性组分, 包括 16 种有机酸、9 种醇类、10 种酯类、10 种芳香族类、3 种含氮类和 2 种其它类组分。选取其中 23 种共有化合物进行半定量分析, 随大曲贮存时间推移其含量变化如图 5 所示。聚类结果显示, 大曲样品分为贮存前 2 个月和后 3 个月及以后两大类。贮存 2 个月内的的大曲风味成分多为酸、醇类物质, 后者酯类、含氮类化合物含量较高, 酸类、醇类含量明显降低。其中, 具有“猪粪臭”的 4-甲基苯酚(4-Methylphenol)^[31]等异嗅味物质以及具有麦芽香气的 3-甲基丁醛(3-Methyl butanal)随大曲贮存时间延长, 其含量明显降低; 而具有花香、甜香的苯乙醇(Phenylethyl alcohol), 具有蘑菇香、水果香的 1-辛烯-3-醇(1-Octen-3-ol), 具有焦糖味、焙烤香的四甲基吡嗪(Tetramethylpyrazine)^[1,32]等对白酒风味有贡献的物质含量升高。从风味物质的组成和含量变化来看, 大曲贮存 3 个月甚至半年以上不仅有利于白酒中贡献风味物质的形成, 也能降低异嗅味物

质, 从而间接影响酒体风味。

2.5 部分风味物质与微生物相关性研究

为研究微生物与风味物质的相关性, 将风味物质的解析结果与宏基因组测序的结果整理, 用 SPSS 软件进行相关性分析, 部分结果如表 2 所示。

表 2 列出了 P 值小于 0.1 的微生物菌属与风味成分对应的相关系数, 从表 2 可以看出乳酸菌类(乳杆菌属、明串珠菌属、片球菌属和魏斯氏菌属等)与乳酸、乙酸均存在显著相关性, 芽孢杆菌属己酸、丁酸以及 2,6-二甲基吡嗪也存在显著的相关性, 醋酸杆菌属与乙酸存在更为显著的相关性, 这些都是与理论知识相一致的结果。值得关注的是醋酸杆菌属与魏斯氏菌属均与 2,5-二甲苯酚存在显著的相关性, 2,5-二甲苯酚具有清甜的香气及烟熏的气味^[31], 未见有报道醋酸杆菌属与魏斯氏菌属能够合成或代谢 2,5-二甲苯酚, 其相关性有待进一步验证。大曲中积累的产酸细菌(乳酸菌等)是白酒酿造过程中酸类、酯类物质形成的基础, 芽孢杆菌代谢产生的含氮类化合物也是白酒风味中重要的组成部分, 微

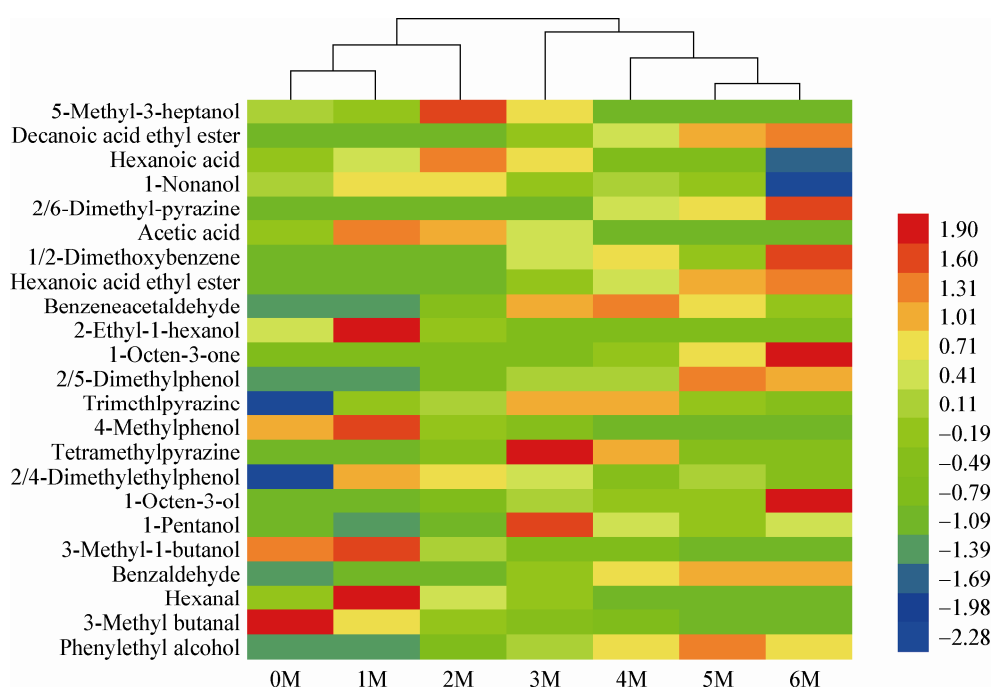


图 5 不同贮存时间大曲挥发性风味物质含量热图

Figure 5 Heat map of volatile flavor substances of *Daqu* in different storage time

表2 部分原核微生物与风味成分相关关系分析
Table 2 Significant pairwise linear regressions for regional prokaryotic microbe and flavor components

原核微生物(属) Prokaryotes microbe	风味成分 Flavor components	P 值 P value	Pearson 相关系数 Pearson's correlation coefficient
<i>Acetobacter</i>	乙酸	0.009	0.96***
	2,5-二甲苯酚	0.069	0.63*
<i>Bacillus</i>	己酸	0.043	0.40**
	丁酸	0.059	0.49*
	2,6-二甲基吡嗪	0.024	0.28**
<i>Lactobacillus</i>	乳酸	0.012	0.78**
	乙酸	0.036	0.50**
<i>Leuconostoc</i>	乳酸	0.029	0.47**
<i>Pedicoccus</i>	乳酸	0.041	0.51**
	2,5-二甲苯酚	0.017	0.77**
<i>Weissella</i>	乳酸	0.053	0.61*

注：显著性大于 90%、95%和 99%的分别用*、**和***标出。
Note: Significant of 90%, 95%, 99% confidence is indicated by *, ** and ***, respectively.

生物的代谢活动对白酒发酵过程中风味物质的产生具有相当重要的意义^[14]。因此，大曲贮存阶段，原核微生物群落结构的调整不仅是后续发酵的动力保证，也是风味物质形成的重要影响因素。

3 结论

与依靠感官经验评定相比，本研究通过对贮存过程中大曲微生物和风味成分的解析，进一步阐述了大曲贮存过程的必要性和重要性。相对于传统方法，本研究采用的 MiSeq 测序方法提供更全面、更接近样品原生态的微生物群落结构，可以更深入地了解大曲中原核微生物多样性和群落结构。

随大曲贮存时间的推移，大曲中原核微生物群落的多样性程度逐渐提高，至贮存 4 个月达到峰值，4 个月以后多样性略有降低。贮存过程中由于大曲品温和水分的降低，细菌群落结构不断调整。贮存前期(0-3 个月)大量存在的嗜热菌(高温放线菌等)相对含量逐渐降低，而芽孢杆菌在大曲中的相对含量增加。贮存中后期(4 个月及以后)由于大曲中水分进一步减少，芽孢杆菌逐渐形成芽孢休眠体，其相对含量减少。在贮存过程中，乳杆菌属的相对含量

一直增加。从微生物的富集及平衡角度来看，大曲贮存 4-6 个月，为后续正常的发酵提供足够的动力和条件，更有利于后续白酒的酿造。

大曲除了为酒醅发酵提供微生物外，也会对白酒风味产生一定的影响。贮存过程中多种酸、醇类物质积累，为白酒酒体中的风味物质提供丰富的前体。此外，大曲贮存过程形成的部分酯类物质直接是白酒风味中重要的呈香成分。高温大曲中带有焦糖和焙烤香气特征的吡嗪等含氮类化合物是形成独特香型白酒风味的重要成分。随大曲贮存时间的推移，对白酒风味有贡献的风味物质不断形成和积累，一些异嗅味物质的含量却不断降低。从风味贡献的角度来看，贮存 4-6 个月的大曲，更有利于优质白酒风味的形成。此外，微生物的代谢活动也是风味物质形成的重要影响因素，贮存阶段大曲原核微生物群落结构和风味组分的调整对于优质白酒的酿造均具有重要意义。

参 考 文 献

- [1] Wang CL, Shi DJ, Gong GL. Microorganisms in *Daqu*: a starter culture of Chinese *Maotai*-flavor liquor[J]. World Journal of Microbiology & Biotechnology, 2008, 24(10): 2183-2190
- [2] Li ZS. The change of chemical compounds of *Daqu* storage for half an year[J]. Liquor-Making Science & Technology, 1991(3): 6-7 (in Chinese)
李增胜. 大曲贮存半年的化学成分变化[J]. 酿酒科技, 1991(3): 6-7
- [3] Xing G, Ao ZH, Deng B. Research & detection progress of microbes in *Daqu*[J]. Liquor-Making Science & Technology, 2012(12): 86-89 (in Chinese)
邢钢, 敖宗华, 邓波. 大曲中微生物研究和检测进展[J]. 酿酒科技, 2012(12): 86-89
- [4] Wang ZY, Peng ZY, Men Y, et al. The preliminary research on the high temperature *Daqu* microflora[J]. Liquor-Making Science & Technology, 1995(3): 66-67 (in Chinese)
王忠彦, 彭追远, 门芸, 等. 高温大曲微生物区系的初步研究[J]. 酿酒科技, 1995(3): 66-67
- [5] Shi AH, Guan JK, Zhang WP, et al. Analysis of microbial species in *Xufang Daqu* & determination of the dominant microbes[J]. Liquor-Making Science & Technology, 2001(6): 26-28 (in Chinese)
施安辉, 关纪奎, 张文璞, 等. 徐坊大曲的微生物区系及其优势菌的鉴定[J]. 酿酒科技, 2001(6): 26-28
- [6] Liao JM, Yao WC, Tang YM, et al. Preliminary taxonomic study of bacteria in *Luzhou*-flavor *Daqu*[J]. Liquor Making, 2001, 28(5): 42-43 (in Chinese)
廖建民, 姚万春, 唐玉明, 等. 浓香型曲药细菌初步分类鉴定研究[J]. 酿酒, 2001, 28(5): 42-43
- [7] Chen TT, Wang MJ, Jiang SY, et al. Investigation of the microbial changes during koji-making process of *Douchi* by culture-dependent techniques and PCR-DGGE[J]. International Journal of Food Science & Technology, 2011, 46(9): 1878-1883
- [8] Zhu YL. Analysis of microbial diversity in Zhejiang rosy rice

- vinegar by PCR-DGGE[D]. Hangzhou: Master's Thesis of Zhejiang Gongshang University, 2009 (in Chinese)
- 朱扬玲. 采用 PCR-DGGE 方法研究浙江玫瑰醋酿造过程中的微生物多样性[D]. 杭州: 浙江工商大学硕士学位论文, 2009
- [9] Zhang X, Zhao J, Du X. Barcoded pyrosequencing analysis of the bacterial community of *Daqu* for light-flavour Chinese liquor[J]. Letters in Applied Microbiology, 2014, 58(6): 549-555
- [10] Zheng XW, Tabrizi MR, Nout MJR, et al. *Daqu*-A traditional Chinese liquor fermentation starter[J]. Journal of the Institute of Brewing, 2011, 117(1): 82-90
- [11] Zhao JS, Zheng J, Wu CD, et al. Study of microbial community structure of sauce-flavor *Daqu* based on PLFA technology[J]. Chinese Journal of Applied and Environmental Biology, 2014, 20(4): 558-563 (in Chinese)
- 赵金松, 郑佳, 吴重德, 等. 基于磷脂脂肪酸技术研究酱香大曲微生物群落结构[J]. 应用与环境生物学报, 2014, 20(4): 558-563
- [12] Hu BD, Wang XD, Ban SD, et al. Research progress of enzyme of *Daqu* in Chinese liquors[J]. Liquor Making, 2015, 42(1): 17-22 (in Chinese)
- 胡宝东, 王晓丹, 班世栋, 等. 白酒大曲酶系研究进展[J]. 酿酒, 2015, 42(1): 17-22
- [13] Hui FL, Ke T, Chu XY, et al. Analysis on community composition and diversity of yeast isolated from *Daqu*[J]. Journal of Food Science and Biotechnology, 2009, 28(1): 102-106 (in Chinese)
- 惠丰立, 柯涛, 褚学英, 等. 大曲中酵母菌种群结构及多样性分析[J]. 食品与生物技术学报, 2009, 28(1): 102-106
- [14] Yang GH, Qiu SY, Huang YG. Microbiology research of liquor production[J]. China Brewing, 2011(4): 24-27 (in Chinese)
- 杨国华, 邱树毅, 黄永光. 酱香白酒生产中产香微生物研究[J]. 中国酿造, 2011(4): 24-27
- [15] Hou XG, Wang JY, Li XS, et al. The research progress on functional aroma-producing microorganisms in *Zaopei* and pit mud of Chinese strong-flavor liquor[J]. Microbiology China, 2013, 40(7): 1257-1265 (in Chinese)
- 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
- [16] Lü L. Aroma analysis of sesame-flavor liquor by key microorganism[D]. Ji'nan: Master's Thesis of Qilu Polytechnic University, 2014 (in Chinese)
- 吕磊. 芝麻香型白酒关键微生物产香分析研究[D]. 济南: 齐鲁工业大学硕士学位论文, 2014
- [17] Wang HY, Zhang XJ, Zhao LP, et al. Analysis and comparison of the bacterial community in fermented grains during the fermentation for two different styles of Chinese liquor[J]. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, 2008, 35(6): 603-609
- [18] Caporaso JG, Lauber CL, Walters WA, et al. Global patterns of 16S rRNA diversity at a depth of millions of sequences per sample[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2011, 108(25): 4516-4522
- [19] Ren GD, Ren WJ, Teng Y, et al. Evident bacterial community changes but only slight degradation when polluted with pyrene in a red soil[J]. Frontiers in Microbiology, 2015, 6: 22
- [20] Zhang CL, Ao ZH, Chui WQ, et al. Characterization of the aroma-active compounds in *Daqu*: a tradition Chinese liquor starter[J]. European Food Research & Technology, 2012, 234(1): 69-76
- [21] Barberán A, Bates ST, Casamayor EO, et al. Using network analysis to explore co-occurrence patterns in soil microbial communities[J]. The ISME Journal, 2012, 6(2): 343-351
- [22] Tang YH, Li HG, Li XH. Study on the function diversity variation of *Daqu* microorganisms during storage relying on Biolog ECO technology[J]. Liquor Making, 2015, 42(1): 75-78 (in Chinese)
- 汤有宏, 李红歌, 李晓欢. 基于 Biolog ECO 技术对贮存过程中大曲微生物多样性变化规律的研究[J]. 酿酒, 2015, 42(1): 75-78
- [23] Xian WD, Ming H, Li WJ. The family Thermoactinomycetaceae[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2015, 55(1): 1-11 (in Chinese)
- 鲜文东, 明红, 李文均. 高温放线菌科最新研究进展[J]. 微生物学报, 2015, 55(1): 1-11
- [24] Xie YQ, Zhong Y, Xie X, et al. Roles & functions of lactic acid bacteria in the production of liquor by solid fermentation[J]. Liquor-Making Science & Technology, 2008(11): 83-86 (in Chinese)
- 谢玉球, 钟雨, 谢旭, 等. 乳酸菌在固态法白酒生产中的地位与作用[J]. 酿酒科技, 2008(11): 83-86
- [25] Shi AH, Zhou B. Classification and physiologic character of *Lactobacillus* and application in production[J]. Chinese Condiment, 2001(11): 3-8 (in Chinese)
- 施安辉, 周波. 乳酸菌分类、生理特性及在食品酿造工业上的应用[J]. 中国调味品, 2001(11): 3-8
- [26] Wu SW, Zhang ZG, Li XH. Current research and development prospects of *Daqu* microbes in the production of *Daqu* liquor[J]. China Brewing, 2011(5): 8-13 (in Chinese)
- 吴生文, 张志刚, 李旭晖. 大曲微生物在大曲酒生产中的研究开发现状及发展前景[J]. 中国酿造, 2011(5): 8-13
- [27] Wang CB. Study on the growth character of *Bacillus* spp.[J]. Chemistry & Bioengineering, 2012, 29(8): 66-69 (in Chinese)
- 王晨波. 芽孢杆菌生长特性的研究[J]. 化学与生物工程, 2012, 29(8): 66-69
- [28] Fuhrman JA. Microbial community structure and its functional implications[J]. Nature, 2009, 459(7244): 193-199
- [29] Lupatini M, Suleiman AKA, Jacques RJS, et al. Network topology reveals high connectance levels and few key microbial genera within soils[J]. Frontiers in Environmental Science, 2014, 2(10): 1-11
- [30] Ju F, Xia Y, Guo F, et al. Taxonomic relatedness shapes bacterial assembly in activated sludge of globally distributed wastewater treatment plants[J]. Environmental Microbiology, 2013, 16(8): 2421-2432
- [31] Fan WL, Xu Y. Flavour Chemistry of Alcoholic Beverages[M]. Beijing: China Light Industry Press, 2014: 147 (in Chinese)
- 范文来, 徐岩. 酒类风味化学[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 2014: 147
- [32] Lü YH, Wang L, Wang DQ, et al. Analysis of the relations between flavoring substances of *Daqu* of different flavor type and its styles and characteristics[J]. Liquor-Making Science & Technology, 2012(7): 72-75 (in Chinese)
- 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): 72-75