

DOI: 10.13652/j.spjx.1003.5788.2024.80403

广西小曲微生物群落与理化指标相关性分析

侯 慧^{1,2} 郝俊光^{2,3} 万瑞杰⁴ 张 龙⁴ 祁 岑³ 戴梓茹³

(1. 广西大学轻工与食品工程学院, 广西 南宁 535000; 2. 北部湾大学食品工程学院钦州市食品风味分析与调控重点实验室, 广西 钦州 535011; 3. 北部湾大学食品工程学院广西高校北部湾海产品高值化利用与预制食品重点实验室, 广西 钦州 535011; 4. 广西天龙泉酒业有限公司, 广西 罗城 546408)

摘要: [目的] 优化广西米香型白酒酿造曲种。[方法] 利用高通量测序技术对广西 4 个米香型白酒小曲的微生物群落进行分析, 采用常规法测定小曲的理化指标, 探究微生物群落结构和理化特性之间的相关性。[结果] 4 种小曲中共检测到 2 个优势真菌门和 9 个优势细菌门, 优势真菌门分别为子囊菌门和毛霉门; 所有小曲中均存在细菌优势门中的厚壁菌门和变形菌门。各小曲中均存在霉菌, 其中小曲 A、B、C 中为根霉属, 小曲 D 中为曲霉属和红曲霉属, 共同的优势细菌属为片球菌属和魏斯氏菌属。在理化指标上, 小曲 A 的糖化力、液化力和发酵力均最大, 小曲 C 的酯化力大于其他小曲。[结论] 优势菌属与理化指标之间存在一定的相关性。

关键词: 广西小曲; 微生物群落; 理化指标; 相关性分析; 酒曲

Correlation analysis between microbial community and physicochemical indexes of Xiaoqu in Guangxi

HOU Hui^{1,2} HAO Junguang^{2,3} WAN Ruijie⁴ ZHANG Long⁴ QI Cen³ DAI Zhiru³

(1. College of Light Industry and Food Engineering, Guangxi University, Nanning, Guangxi 535000, China; 2. Qinzhou Key Laboratory of Food Flavor Analysis and Control, College of Food Science and Engineering, Beibu Gulf University, Qinzhou, Guangxi 535011, China; 3. Guangxi College and University Key Laboratory of High-value Utilization of Seafood and Prepared Food in Beibu Gulf, College of Food Engineering, Beibu Gulf University, Qinzhou, Guangxi 535011, China; 4. Guangxi Tianlongquan Wine Co., Ltd., Luocheng, Guangxi 546408, China)

Abstract: [Objective] Optimization of Xiaoqu varieties in Guangxi for brewing rice-flavored Baijiu. [Methods] High-throughput sequencing was used to analyze the microbial communities of four Guangxi rice flavored Baijiu Xiaoqu, the physicochemical indexes of Xiaoqu were determined by the conventional methods, then the correlation between physicochemical indexes and the microbial communities was clarified. [Results] Two dominant fungal phyla and nine dominant bacterial phyla were detected in four Xiaoqu samples. The dominant fungal phyla were Ascomycota and Mucoromycota. As the dominant phyla of bacteria, Firmicutes and Proteobacteria are present in all Xiaoqu. Mould was found in all Xiaoqu samples, namely, *Rhizopus* was found in Xiaoqu A, B, and C, and *Aspergillus* and *Monascus* were found in Xiaoqu D. The common dominant bacterial genera are *Pediococcus* and *Weissella*. In terms of physicochemical indexes, the saccharification power, liquefaction power and fermentation power of Xiaoqu A were all the biggest, while the esterification power of Xiaoqu C was greater than that of the other three Xiaoqu. [Conclusion] There is a certain correlation between relevant microorganisms and physicochemical indexes.

Keywords: Guangxi Xiaoqu; microbial communities; physicochemical indexes; correlation analysis; Jiuqu

酒曲是白酒酿造的糖化剂、发酵剂和生香剂, 含有多种微生物及其产生的酶, 酿造白酒中使用的酒曲主要有大曲、小曲等^[1]。传统小曲一般以高粱、大米、玉米、小麦等为原料制成, 因其体积小而得名, 具有糖化力强、制作

基金项目: 广西壮族自治区科技计划项目(编号: AB21196002); 钦州市科学研究与技术开发计划(编号: 20223631); 河池市科技计划项目(编号: 2024hckj-tlq)

通信作者: 郝俊光(1971—), 男, 北部湾大学教授, 博士。E-mail: hjpgkzhrq@163.com

收稿日期: 2024-04-29 **改回日期:** 2024-11-13

周期短等特点,用其酿造出来的白酒具有一种清雅的香气和醇甜的口感^[2]。酒的品质与酒曲密不可分,酒曲样本的取样方式、取样地点、贮存时间、生产原料、制曲工艺等均对小曲发酵剂中微生物的组成有显著影响^[3-4]。小曲发酵剂中微生物群落的多样性和协调性又决定了酒的风味物质分布^[4-5]。

随着生物技术的发展,具有检测速度快、通量大和灵敏度高优点的高通量测序技术(HTS)被广泛应用于酒曲微生物检测等领域^[6-7],而目前白酒酿造小曲的微生物多样性研究主要集中在四川和湖北等地区。Gou等^[8]研究了四川小曲样品的微生物多样性,鉴定出的优势细菌为食窦魏斯氏菌(*Weissella cibaria*)和路德维希肠杆菌(*Enterobacter ludwigii*),优势真菌为米根霉(*Rhizopus oryzae*)、酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)以及扣囊复膜孢酵母(*Saccharomycopsis fibuligera*)。Wu等^[9]利用HTS对四川、湖北的小曲进行微生物群落比较,发现四川彭州小曲的优势真菌为匍枝根霉(*Rhizopus stolonifer*)和酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*),优势细菌为食窦魏斯氏菌(*Weissella cibaria*)、葡萄球菌(*Staphylococcus*)和短稳杆菌(*Empedobacter*);四川大竹小曲中优势真菌为酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)和芬尼克念珠菌(*Candida fennica*),优势细菌为食窦魏斯氏菌(*Weissella cibaria*)和葡萄球菌(*Staphylococcus*);湖北资源小曲中优势真菌为匍枝根霉(*Rhizopus stolonifer*)、酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)、灰色小克银汉霉(*Cunninghamella bertholletiae*),优势细菌为食窦魏斯氏菌(*Weissella cibaria*)和短稳杆菌(*Empedobacter*)。Wang等^[5]利用HTS分析了四川、云南、湖北小曲中的微生物多样性,所有样品中共检出14个优势细菌属,分别为草本杆菌属(*Herbaspirillum*)、葡萄球菌属(*Staphylococcus*)、乳酸菌属(*Lactobacillus*)、魏斯氏菌属(*Weissella*)、醋酸杆菌属(*Acetobacter*)、假单胞菌属(*Pseudomonas*)、芽孢杆菌属(*Bacillus*)、鞘氨醇单胞菌属(*Sphingobacterium*)、克雷伯菌属(*Klebsiella*)、窄食单胞菌属(*Stentrophomonas*)、片球菌属(*Pediococcus*)、地芽胞杆菌属(*Geobacillus*)、肠杆菌属(*Enterobacillus*)和石单胞菌属(*Pelomonas*);检测到5个优势真菌属为根霉属(*Rhizopus*)、变形担子菌酵母属(*Apiotrichum*)、假丝酵母属(*Candida*)、曲霉属(*Aspergillus*)和毛孢菌属(*Trichosporon*)。

研究拟采用高通量测序技术,解析广西地区4种不同小曲中微生物群落结构,测定其理化指标并绘制相关性热图,以期明晰广西小曲曲种的区域间差异,为广西米香型白酒酿造曲种的优化提供依据。

1 材料与方 法

1.1 主要材料与试剂

米香型白酒酿造小曲:分别采自南宁市红土壤食品加工坊、桂林市平乐县唐风酒饼加工厂、贵港市平南县大

安镇柱满酒饼厂、广西天龙泉酒业有限公司,各小曲均取自同一批次,生产日期为2023年9月,分析时样品已分别于-80℃,4℃冰箱中贮藏3个月;

无水乙醇、氢氧化钠、葡萄糖、碘、碘化钾、硫酸、盐酸、酒石酸钾钠等:分析纯,上海麦克林生化科技股份有限公司;

硫酸铜、亚甲基兰:分析纯,上海阿拉丁生化科技股份有限公司;

亚铁氰化钾:分析纯,上海源叶生物科技有限公司;

无水乙酸钠、冰乙酸:色谱纯,上海源叶生物科技有限公司;

可溶性淀粉、琼脂糖:生化试剂,北京博美富鑫科技有限公司;

TGuide S96 DNA提取试剂盒:天根生化科技(北京)有限公司;

快速高保真DNA聚合酶:北京全式金生物技术有限公司。

1.2 仪器与设备

瞬时离心机:OSE-MC8型,天根生化科技(北京)有限公司;

梯度基因扩增仪:veriti96well9902型,美国Applied Biosystems公司;

四维旋转混匀仪:BE-1100型,海门市其林贝尔仪器制造有限公司;

电子分析天平:ME204E型,梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司;

恒温水浴锅:DK-98-II型,天津市泰斯特仪器有限公司;

去离子水发生器:Milli-Q型,美国Millipor公司;

旋涡混合器:XW-80A型,常州万科仪器有限公司;

落地式低温摇床:INNOVA43R型,上海巴玖实业有限公司。

1.3 方法

1.3.1 小曲中DNA提取及PCR扩增

(1) DNA提取:采用TGuide S96土壤微生物DNA强力提取试剂盒提取样品中的DNA。

(2) PCR扩增:真菌引物ITS1F(5'-CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA-3')和ITS2R(5'-GCTGCGTTCTTCATCGATGC-3');细菌扩增引物为338F(5'-ACTCCTACGGGAGGCAGCA-3')和806R(5'-GGACTACHVGGGTWTCTAAT-3'),PCR扩增体系为正反引物各0.3 μL,基因组DNA 5 ng, KOD FX Neo 0.2 μL, buffer 5 μL, dNTP 2 μL,用双蒸水(ddH₂O)补至10 μL。

(3) PCR扩增程序:95℃预变性5 min;95℃变性30 s,50℃退火30 s,72℃延伸40 s,共25个循环;72℃再延伸7 min。用1.8%的琼脂糖凝胶电泳检测PCR扩增产物,根据电泳结果用ImageJ软件定量,文库通过Qsep-400

方法进行质检,并使用 Illumina novaseq6000 平台测序。

1.3.2 小曲理化指标测定

- (1) 水分含量、液化力:参考 QB/T 4257—2011。
- (2) 糖化力、发酵力:参考江威等^[10]的方法。
- (3) 酯化力:参考刘小改等^[11]的方法。

1.4 数据处理

使用 QIIME2 2020.6 软件中的 dada2 方法对测序所得的真菌和细菌序列进行去噪,将相似性 $\geq 97\%$ 的序列归为 1 个操作分类单元(OTU)。利用 Origin 2021 等统计软件对理化指标数据进行处理,使用 python2 软件绘制物种分布图、主成分分析图等,利用 SPSS Statistics 26.0 计算微生物与理化指标之间的 Spearman 相关系数,使用 Origin 2021 软件绘制微生物和理化指标的相关性热图。

2 结果与分析

2.1 微生物多样性

2.1.1 测序结果及 α -多样性分析 由表 1 可知,4 种小曲优化后共得到 578 823 条有效真菌序列和 495 770 条有效细菌序列。物种 α -多样性主要反映了样品中的物种丰度及物种多样性,其衡量指标主要包括 Shannon、Chao1、ACE、Simpson 等指数。其中,Shannon 指数和 Simpson 指数值越高,代表群落多样性越高;Chao1 指数和 ACE 指数值越高,代表物种丰度越大^[12]。4 种小曲真菌 α -多样性分析结果中,Shannon 指数最高的为小曲 A;Chao1 指数和

ACE 指数最高的为小曲 C;细菌 α -多样性分析结果中,Shannon 指数、Chao1 指数和 ACE 指数最高的均为小曲 B。说明小曲 A 的真菌群落多样性最高,小曲 C 的真菌物种丰度最高,小曲 B 的细菌群落多样性和细菌物种丰度均最高。Coverage 数值表示样本序列覆盖率,所有样品的 Coverage 指数均为 1.000 0,表明样品序列被完全测出,各样品的测序结果可靠^[4]。各样品中真菌和细菌菌群的 Shannon 指数曲线如图 1 所示,随着测序深度的增加,各样品曲线趋于平稳,表明测序量充足,测序数据合理^[13]。

表 1 4 种小曲样品测序结果及 α -多样性分析结果
Table 1 Sequencing results and α -diversity analysis results of four Xiaoqu samples

| 菌群 | 样品 | 有效序列/条 | Shannon 指数 | Chao1 指数 | ACE 指数 | Coverage 指数 |
|----|----|---------|------------|-----------|-----------|-------------|
| 真菌 | A | 142 800 | 2.109 1 | 60.000 0 | 60.000 0 | 1.000 0 |
| | B | 146 699 | 0.737 0 | 46.000 0 | 39.311 9 | 1.000 0 |
| | C | 145 499 | 0.985 4 | 243.000 0 | 241.834 5 | 1.000 0 |
| | D | 143 825 | 2.107 6 | 33.000 0 | 32.641 6 | 1.000 0 |
| 细菌 | A | 132 309 | 6.304 3 | 780.000 0 | 780.000 0 | 1.000 0 |
| | B | 131 274 | 6.970 0 | 789.000 0 | 789.165 4 | 1.000 0 |
| | C | 95 674 | 6.670 7 | 613.000 0 | 613.151 1 | 1.000 0 |
| | D | 136 513 | 3.194 7 | 314.000 0 | 308.742 1 | 1.000 0 |

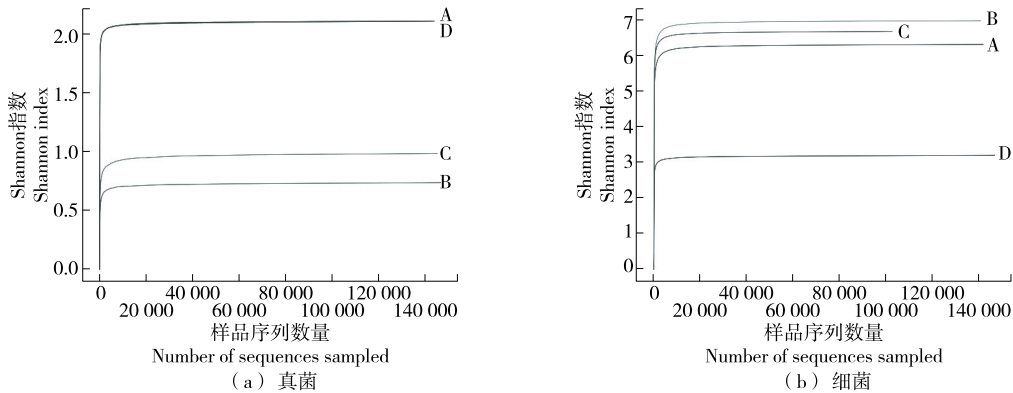


图 1 4 种小曲中真菌和细菌的 Shannon 指数曲线
Figure 1 Shannon index curves for fungi and bacteria of four Xiaoqu samples

2.1.2 基于 OTU 的 Venn 图分析 Venn 图可以展示样品之间共有 OTU 以及特有 OTU 数,直观地表现出样品间 OTU 的重合情况,有利于比较样品间 OTU 组成的异同,并可以反映样品组中的微生物多样性^[14]。由图 2(a)可知,A、B、C、D 4 种小曲中真菌 OTU 数分别为 60,36,241,32 个,各小曲特有的真菌 OTU 数分别为 43,17,218,17 个,共有的真菌 OTU 数为 6 个。由图 2(b)可知,A、B、C、D 4 种小曲中细菌 OTU 数分别为 780,789,613,308 个,各小曲特有的细菌 OTU 数分别为 622,605,434,215 个,共有的细菌 OTU 数为 43 个。综上,真菌多样性最高的为

小曲 C,细菌多样性最高的为小曲 B。

2.2 微生物群落结构

2.2.1 基于门水平的微生物群落组成 将物种注释结果中相对丰度 $> 1\%$ 的门定义为优势菌门,则 4 种小曲中共检出 2 个优势真菌门和 9 个优势细菌门。选取每个小曲样品在门水平上相对丰度前 10 的物种,绘制物种相对丰度统计图,结果如图 3 所示。由图 3(a)可知,所有样品中检出的 2 个优势真菌门为子囊菌门(Ascomycota)和毛霉门(Mucoromycota)。子囊菌门作为共同绝对优势真菌门存在于 4 种小曲中,相对丰度均 $> 93\%$,说明该门微生物

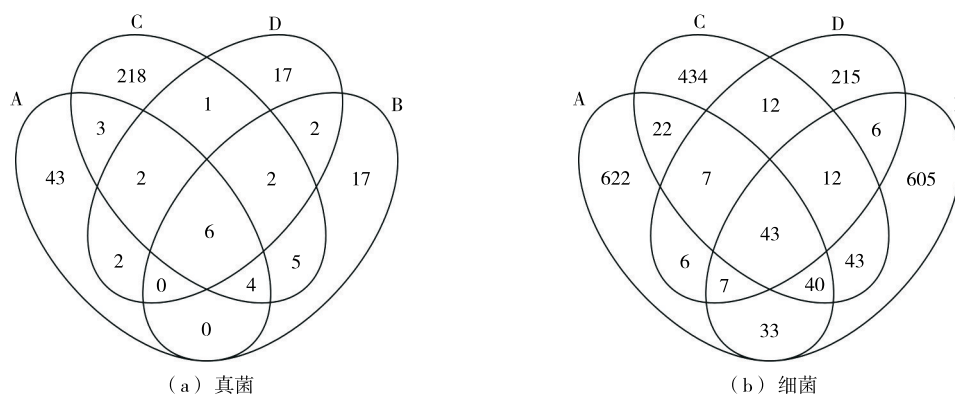


图2 不同小曲样品中真菌和细菌 OTU 的 Venn 图

Figure 2 Venn diagrams of fungal and bacterial OTUs of different Xiaoqu samples

在白酒发酵中起重要作用,与宁亚丽等^[14]的研究结果一致。由图 3(b)可知,拟杆菌门(Bacteroidota)存在于 4 种小曲中。小曲 A、B、C 中均存在放线菌门(Actinobacteriota)、蓝藻门(Cyanobacteria)和骸骨细菌门(Patescibacteria)。小曲 B 和 C 中存在梭杆菌门(Fusobacteriota)和 unclassified Bacteria。小曲 A 和 C 中存在纳米古菌门(Nanoarchaeota)。其中厚壁菌门(Firmicutes)和变形菌门

(Proteobacteria)存在于所有小曲中,厚壁菌门在小曲 D 中的相对丰度最大,达 92.27%;变形菌门在小曲 B 中的相对丰度最大,为 49.74%。王清龙等^[4]研究发现,厚壁菌门作为优势细菌门存在于三类酒曲中,且该门具有产生己酸和降低发酵液乳酸的功能。Zhao 等^[15]发现厚壁菌门、变形菌门和放线菌门作为优势细菌门存在于传统小曲中,与试验结果一致。

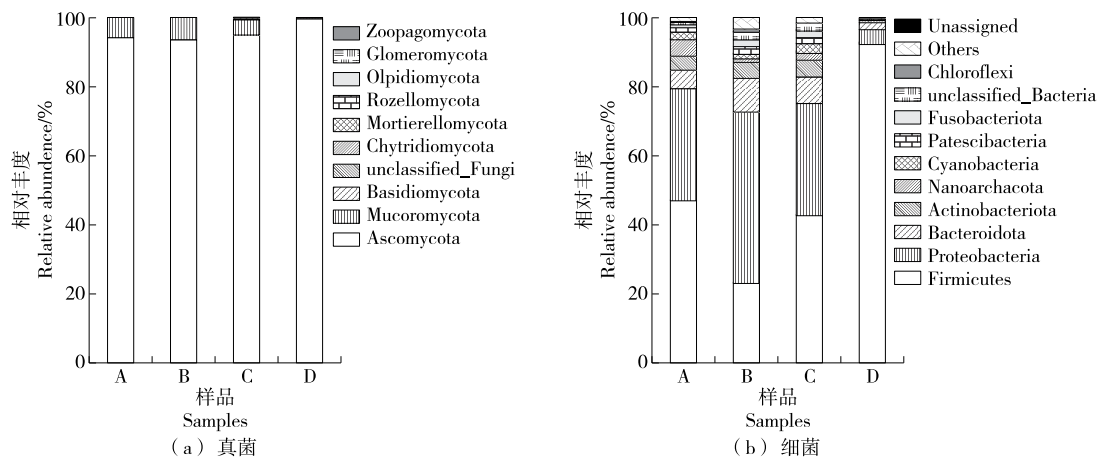


图3 各样品在门水平前10的真菌和细菌相对丰度统计图

Figure 3 Relative abundance statistics of the top 10 fungi and bacteria at the phylum level for Xiaoqu samples

2.2.2 基于属水平的微生物群落组成 将物种注释结果相对丰度>1%的属定义为优势菌属,则 4 种小曲中共检出 8 个优势真菌属和 37 个优势细菌属。选取每个小曲样品在属水平上相对丰度前 10 的物种,绘制物种相对丰度统计图,如图 4 所示。由图 4(a)可知,小曲 A 中检出的优势真菌属为假丝酵母属(Candida)、unidentified、曲霉属(Aspergillus)、根霉属(Rhizopus)和酵母属(Saccharomyces)。小曲 B 中检出的优势真菌属为 unidentified、根霉属(Rhizopus)和拟威尔嗜杀酵母属(Cyberlindnera)。小曲 C 中检出的优势真菌属为 unidentified、异常威克汉姆酵母属(Wickerhamomyces)和根霉属(Rhizopus)。小曲 D 中检

出的优势真菌属为曲霉属(Aspergillus)、unidentified、酵母属(Saccharomyces)和红曲霉属(Monascus)。霉菌是形成分枝菌丝的真菌统称,种类繁多,常见的霉菌有根霉属、毛霉属、青霉属、曲霉属等^[16]。4 种小曲中均检出了霉菌,小曲 A、B、C 中检出的霉菌为根霉属(Rhizopus),小曲 D 中的为曲霉属(Aspergillus)和红曲霉属(Monascus)。霉菌能产生多种活性酶,如糖化酶、纤维素酶、蛋白酶、酯化酶、果胶酶等,可促进酿造原料的降解和呈香、呈味物质的形成^[17-18],如根霉属可促进乳酸、乙醇、2-甲基-1-丁醇和 3-甲基-1-丁醇等挥发性化合物的生成^[7]。曲霉属是糖化、发酵和酯化过程中的关键霉菌,可通过分泌多种胞外

酶来降解纤维素、淀粉和蛋白质等大分子物质^[19-20]。假丝酵母属在小曲中的相对丰度较大,其分泌的酯酶可促进乳酸乙酯与乙酸乙酯的合成^[21]。

由图 4(b)可知,小曲 A 中相对丰度排名前 5 的优势细菌属依次为芽孢杆菌属(*Bacillus*)、泛菌属(*Pantoea*)、罗伊氏乳杆菌属(*Limosilactobacillus*)、魏斯氏菌属(*Weissella*)和未分类的乌斯古菌属(*unclassified Woearchaeales*)。小曲 B 中相对丰度排名前 5 的优势细菌属为肠杆菌属(*Enterobacter*)、未分类的肠菌属(*unclassified Enterobacteriaceae*)、链球菌属(*Streptococcus*)、魏斯氏菌属(*Weissella*)和韦荣氏球菌(*Veillonella*)。小曲 C 中相对丰度前 5 的优势细菌属依次为乳球菌属(*Lactococcus*)、葡萄糖杆菌属(*Gluconobacter*)、肠杆菌属(*Enterobacter*)、魏斯氏菌属

(*Weissella*)和明串珠菌属(*Leuconostoc*)。小曲 D 中相对丰度前 5 的优势细菌属依次为魏斯氏菌属(*Weissella*)、片球菌属(*Pediococcus*)、罗伊氏乳杆菌属(*Limosilactobacillus*)、葡萄糖杆菌属(*Gluconobacter*)和醋酸菌属(*Acetobacter*)。细菌在酿酒过程中的主要作用是产生风味成分及其前体,是白酒独特风味的重要来源^[22]。如芽孢杆菌属能产生淀粉酶和蛋白酶,分解大分子物质,形成风味产物 C₄ 化合物(吡嗪类化合物、挥发性酸、芳香族和酚类化合物)^[23-24];乳球菌属是酒曲中常见的细菌属,能产生乳酸,促进乳酸乙酯的形成^[25];片球菌属可利用碳水化合物产生酸和乙醇^[21];魏斯氏菌属可将糖类转化生成乳酸并合成短链脂肪酸^[26];泛菌属可促进乙酸丙酯、丁酸甲酯、1-丁醇、2-庚酮、2-戊酮丙醛、糠醛等醇、酯、酮、醛的产生^[27]。

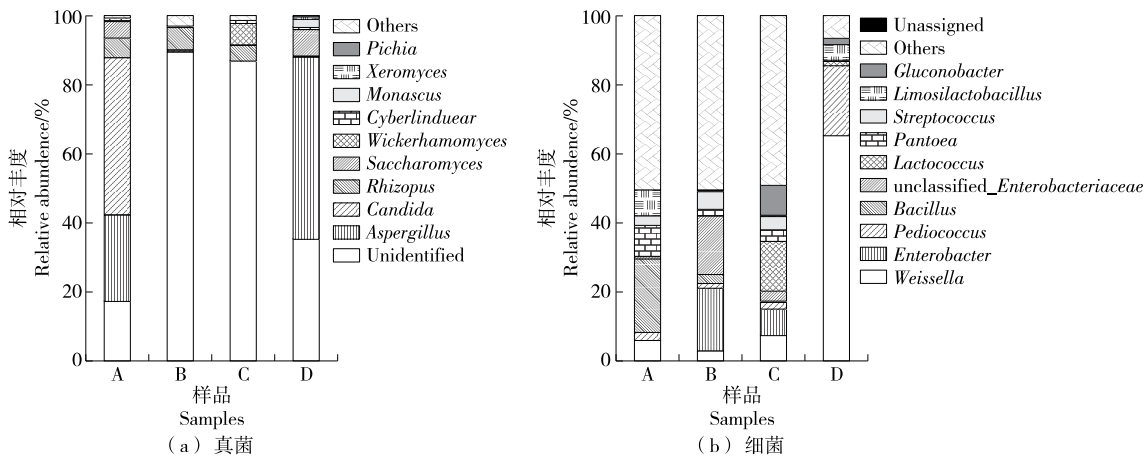


图 4 各样品在属水平前 10 的真菌和细菌的相对丰度统计图

Figure 4 Relative abundance statistics of the top 10 fungi and bacteria genus of samples

2.3 基于属水平的物种丰度聚类热图

为了更加直观地比较各样品间微生物的多样性,取样品中相对丰度在属水平>1%的优势微生物进行物种丰度聚类热图分析,结果如图 5 所示。纵向聚类树表示不同样品间同一微生物丰度的相似情况;横向聚类树表示各样品在属水平相对丰度>1%的物种相似情况^[28]。由图 5(a)可知,假丝酵母属(*Candida*)在小曲 A 中的相对丰度最高;拟威尔嗜杀酵母属(*Cyberlindnera*)在小曲 B 中的相对丰度最高;异常威克汉姆酵母属(*Wickerhamomyces*)在小曲 C 中的相对丰度最高;曲霉属(*Aspergillus*)、酵母属(*Saccharomyces*)和红曲霉属(*Monascus*)在小曲 D 中的相对丰度较高。由图 5(b)可知,泛菌属(*Pantoea*)、芽孢杆菌属(*Bacillus*)、罗伊氏乳杆菌属(*Limosilactobacillus*)等在小曲 A 中的相对丰度较高;肠杆菌属(*Enterobacter*)、克罗诺杆菌属(*Cronobacter*)、unclassified *Muribaculaceae* 等在小曲 B 中的相对丰度较高;科萨克氏菌属(*Kosakonia*)、葡萄糖杆菌属(*Gluconobacter*)、乳球菌属

(*Lactococcus*)等在小曲 C 中的相对丰度较高;片球菌属(*Pediococcus*)、魏斯氏菌属(*Weissella*)、醋酸菌属(*Acetobacter*)在小曲 D 中的相对丰度较高。从样品聚类结果可知,小曲 A 和 D、小曲 C 和 B 的真菌属、细菌属均聚为一类,表明了样品中相对丰度相近。值得注意的是,克罗诺杆菌属(*Cronobacter*)在小曲 B 中的相对丰度较高,为一种食源性病原菌,应引起酿酒者的足够重视^[29]。

2.4 基于属水平的微生物群落相似性

由图 6(a)可知,真菌第一主成分和第二主成分的贡献率分别为 80.06% 和 19.64%,能解释 99.70% 的微生物群落差异;由图 6(b)可知,细菌第一主成分和第二主成分的贡献率分别为 77.65% 和 15.01%,能解释 92.66% 的微生物群落差异。从发散程度上看,小曲 B 和 C 中的真菌、细菌群落结构相似,而小曲 A 和 D 中的差异较大。对样品进行层级聚类分析也可以反映不同样品的相似性和差异性,对应分析如图 7 所示。由图 7(a)可知,在真菌分类中,小曲 A 单独聚为一类,小曲 B、C、D 聚为一类。由图 7(b)

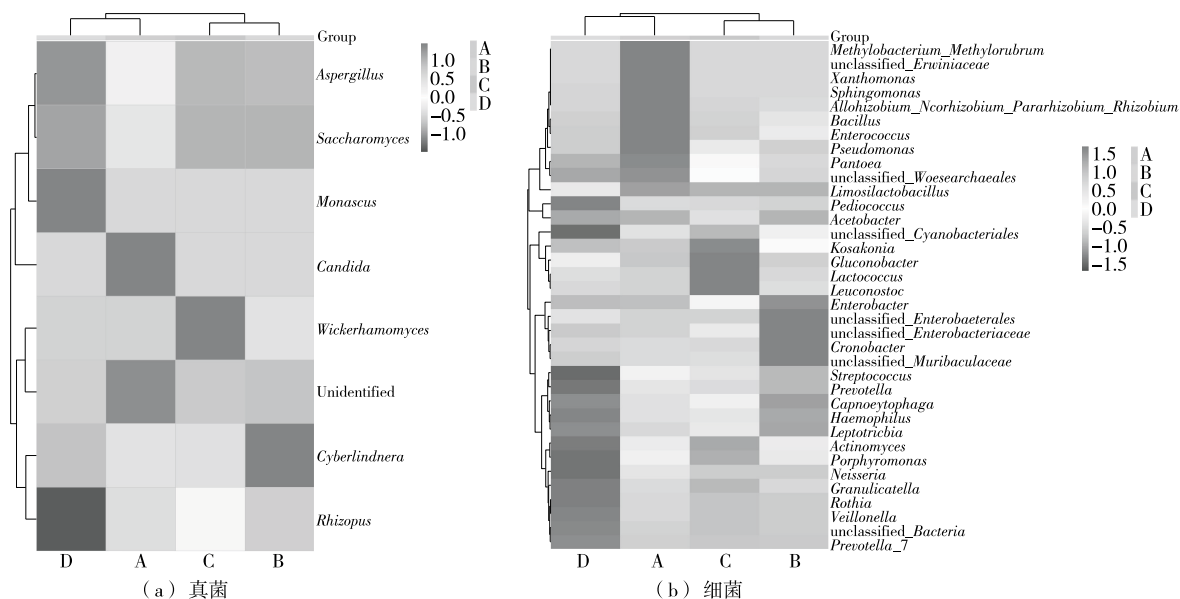


图5 基于属水平真菌和细菌的物种丰度聚类热图

Figure 5 Cluster heat map of fungal and bacterial abundance based on genus level

可知,在细菌分类中,小曲A、B、C聚为一类,小曲D单独聚为一类,其中小曲B、C在真菌和细菌分类中枝长均最短,说明这两个样品的物种组成最接近,与主成分分析结

果一致。4种小曲在属水平上未鉴别的真菌相对丰度较高,且被冠以同一名称,可能影响了相似性的分析结果,该点容易被忽略^[28]。

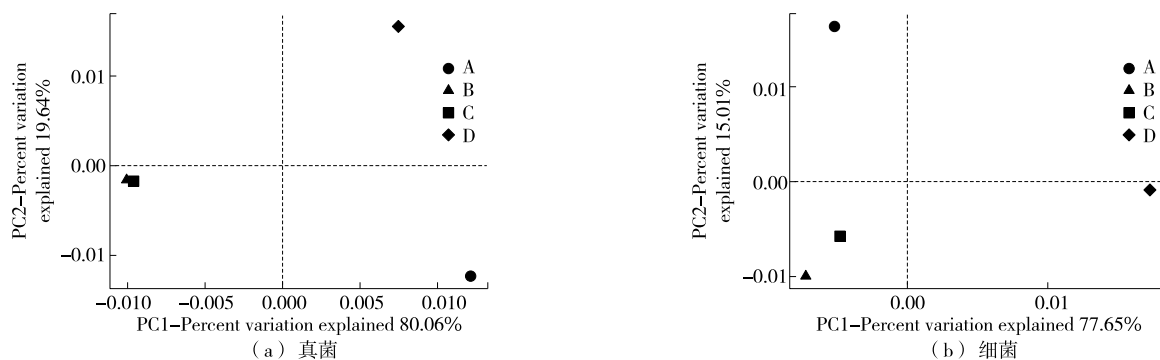


图6 4种小曲样品真菌和细菌的群落结构主成分分析

Figure 6 Principal component analysis of fungal and bacterial community structure of four Xiaoqu samples

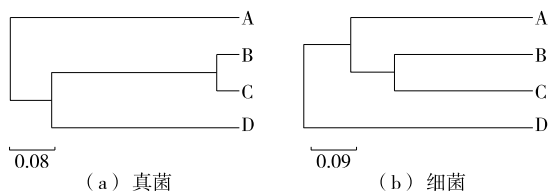


图7 小曲样品在属水平上真菌和细菌的层级聚类树

Figure 7 Hierarchical cluster tree of fungi and bacteria of Xiaoqu samples based on genus level

2.5 理化指标差异分析

由表2可知,4种小曲中水分含量从高到低依次为小曲D、小曲C、小曲B、小曲A,水分含量是评价小曲品质的

标准之一,通常随着发酵时间和贮存时间的延长而降低,一般认为酒曲中的水分含量应<13%^[30-31]。除小曲D外,其他3种小曲中的水分含量均<13%。糖化力和液化力是衡量酒曲发酵性能的重要指标,且两者呈正相关,所测小曲糖化力与液化力变化趋势相同。小曲D的糖化力和液化力最低,小曲A的最高,液化力主要受酒曲中淀粉酶活性影响,而芽孢杆菌属、假丝酵母属有助于淀粉酶的分泌,二者在小曲A中的相对丰度最大^[21]。发酵力是酒曲产酒能力的重要标志,酯化力是酯化酶活性的表现,而酯化酶是脂肪酶和酯酶的统称,一般由酵母菌、细菌、霉菌等微生物生成,二者均影响米香型白酒的出酒率和品质^[31-32]。由表2可知,小曲A的发酵力最大,小曲C的酯

化力最高。由于地域差异、制曲工艺差异等,小曲的理化指标也随之变化。如与河南地区的小曲理化指标相比,广西地区小曲的糖化力、酯化力均较低,特别是酯化力,

河南地区小曲的为 2 058.00 U,而试验所测广西 4 种小曲的为 96.86~330.35 U^[4]。但与广东地区的小曲酯化力相比,广西地区的酯化力均大于广东地区^[32]。

表 2 不同小曲样品的理化指标测定结果[†]

Table 2 Determination results of physicochemical indexes of different Xiaoqu samples

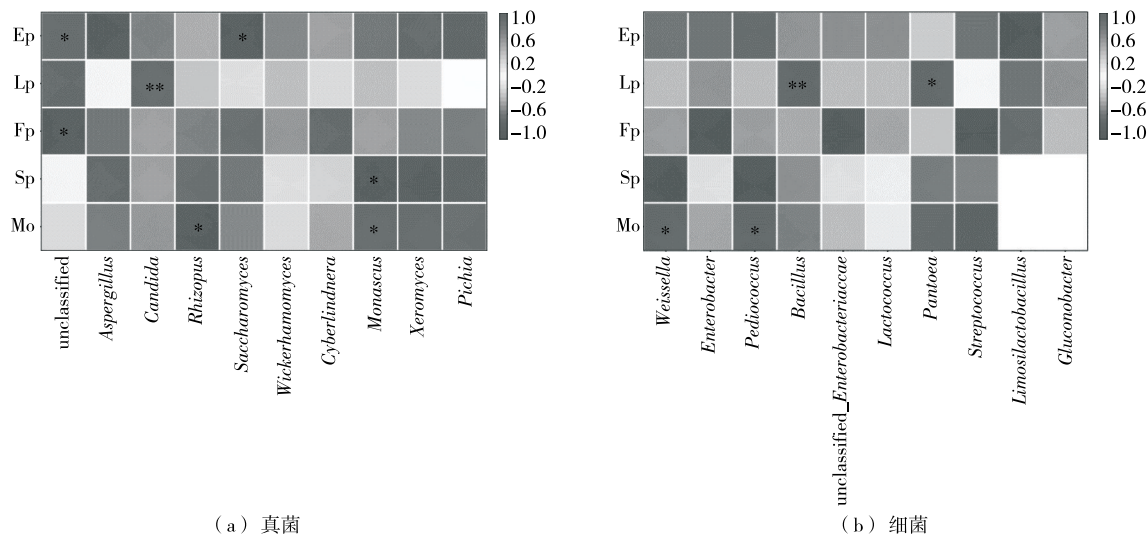
| 样品 | 水分/% | 糖化力/(10 ⁻² ·g·g ⁻¹) | 液化力/U | 发酵力/%vol | 酯化力/U |
|----|-------------------------|--|-------------------------|-------------------------|--------------------------|
| A | 7.08±0.12 ^d | 43.87±0.42 ^a | 24.88±0.33 ^a | 34.97±0.78 ^a | 110.63±0.50 ^e |
| B | 8.34±0.21 ^c | 36.13±0.64 ^b | 1.14±0.03 ^b | 18.43±0.50 ^e | 315.59±0.58 ^b |
| C | 8.69±0.05 ^b | 37.07±0.92 ^b | 1.14±0.02 ^b | 22.60±0.44 ^b | 330.35±0.34 ^a |
| D | 15.68±0.16 ^a | 16.40±0.53 ^c | 0.42±0.02 ^c | 34.60±0.44 ^a | 96.86±0.23 ^d |

† 小写字母不同表示差异显著(P<0.05)。

2.6 理化指标与主要微生物属间的相关性

为了更直观了解理化指标与微生物之间的相关性,取属水平上平均丰度前 10 的微生物属与小曲理化指标进行 Spearman 相关性分析,结果如图 8 所示。由图 8(a)可知,假丝酵母属(*Candida*)与液化力呈显著正相关(P<0.01),其为小曲 A 的优势真菌属,具有较高的产淀粉酶的能力,这可能是小曲 A 的糖化力和液化力大于其他 3 种小曲的原因之一^[33]。红曲霉属(*Monascus*)与水分含量显著正相关(P<0.05),与吴正坤等^[34]的研究结果一致。红曲霉属(*Monascus*)与糖化力呈显著负相关(P<0.05)。异

常威克汉姆酵母属(*Wickerhamomyces*)与酯化力呈正相关,主要作为非酿酒酵母属存在于酒曲中,尽管其产乙醇的能力较弱,但具有的高酶活力有利于改善酒体的香气、口感等^[22]。由图 8(b)可知,魏斯氏菌属(*Weissella*)、片球菌属(*Pediococcus*)与水分含量显著正相关(P<0.05)。芽孢杆菌属(*Bacillus*)与液化力极显著正相关(P<0.01),这可能与其分泌淀粉酶、蛋白酶、脂肪酶和纤维素酶等多种水解酶有关^[23]。泛菌属(*Pantoea*)与液化力呈显著正相关,其在小曲 A 中的丰度最大,可能是小曲 A 的液化力大于其他 3 种小曲的潜在原因之一。



*表示在 0.05 级别(双尾),相关性显著;**表示在 0.01 级别(双尾),相关性显著;Ep 表示酯化力;Lp 表示液化力;Fp 表示发酵力;Sp 表示糖化力;Mo 表示水分含量

图 8 小曲中真菌属、细菌属与理化指标的 Spearman 相关性分析结果

Figure 8 Spearman correlation analysis results between fungal genera and bacterial genera in Xiaoqu samples and physicochemical indexes

3 结论

利用高通量测序技术对广西地区 4 种不同小曲的微生物群落结构进行了解析。结果表明,在门水平上,4 种

不同来源的小曲中共检出 2 个优势真菌门和 9 个优势细菌门;在属水平上,4 种小曲中共检出 8 个优势真菌属和 37 个优势细菌属,其中霉菌存在于所有的小曲中,小曲

A、B、C的优势细菌属为根霉属(*Rhizopus*),小曲D的为曲霉属(*Aspergillus*)和红曲霉属(*Monascus*),4种小曲的共同优势细菌属为片球菌属(*Pediococcus*)和魏斯氏菌(*Weissella*)。此外,克罗诺杆菌属(*Cronobacter*)在小曲B中的相对丰度较高,作为一种食源性的病原菌,酿酒者应重视。小曲B和C中的真菌、细菌群落结构最相似。在理化指标上,小曲A的糖化力、液化力和发酵力最大,小曲C的酯化力最大。属水平的相关性热图表明,优势微生物属与其理化指标之间存在一定的相关性。小曲中微生物群落是一个复杂的体系,该研究分析其与理化指标相关性时,并未涉及微生物之间的相互作用以及外部因素的影响。在后续研究工作中,可以进一步对不同酒曲发酵过程中的微生物进行解析,考虑微生物之间的相互作用,并结合培养组学技术合理调整菌群丰度,以期酿酒产业发展提供解决思路。

参考文献

- [1] 王毅,罗惠波,王彩虹.小曲酒酿造微生物研究进展[J].酿酒科技,2014(4):78-82.
WANG Y, LUO H B, WANG C H. Research progress in microbes for the production of Xiaoqu[J]. Liquor-Making Science & Technology, 2014(4): 78-82.
- [2] 边名鸿,万世旅,代梅,等.产酒酵母的筛选鉴定及其在小曲中的应用[J].中国酿造,2016,35(3):57-60.
BIAN M H, WAN S L, DAI M, et al. Screening and identification of Baijiu (liquor)-making yeast and its application in Xiaoqu[J]. China Brewing, 2016, 35(3): 57-60.
- [3] 黄治国,刘娜,卫春会,等.高温大曲曲房空气中可培养细菌的分离鉴定及产酶特性[J].食品与机械,2021,37(5):15-21.
HUANG Z G, LIU N, WEI C H, et al. Isolation, identification and enzyme production characteristics of culturable bacteria in the air of high-temperature Daqu fermentation room[J]. Food & Machinery, 2021, 37(5): 15-21.
- [4] 王清龙,朱甜甜,刘延波,等.白酒生产不同酒曲微生物群落结构、理化指标及挥发性风味物质研究[J].中国酿造,2023,42(7):93-102.
WANG Q L, ZHU T T, LIU Y B, et al. Microbial community structure, physicochemical indexes and volatile substances of different Jiuqu in Baijiu production[J]. China Brewing, 2023, 42(7): 93-102.
- [5] 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: 1-2.
- [6] 吴成,程平言,谢丹,等.酱香型白酒高温大曲发酵过程中真菌多样性研究[J].食品与生物技术学报,2023,42(6):95-103.
WU C, CHENG P Y, XIE D, et al. Investigation on fungal diversity during high-temperature Daqu fermentation of sauce-flavor Baijiu[J]. Journal of Food Science and Biotechnology, 2023, 42(6): 95-103.
- [7] CAPORASO J G, LAUBER C L, WALTERS W A, et al. Ultra-high-throughput microbial community analysis on the Illumina HiSeq and MiSeq platforms[J]. The ISEM Journal, 2012, 6(8): 1 621-1 624.
- [8] GOU M, WANG H Z, YUAN H W, et al. Characterization of the microbial community in three types of fermentation starters used for Chinese liquor production[J]. Journal of the Institute of Brewing, 2015, 121(4): 620-627.
- [9] WU H C, ZHANG S Y, MA Y Y, et al. Comparison of microbial communities in the fermentation starter used to brew Xiaoqu liquor[J]. Journal of the Institute of Brewing, 2017, 123(1): 113-120.
- [10] 江威,章刚,张龙,等.添加中药材对绿衣观音土曲品质影响及相关性分析[J].中国酿造,2024,43(1):169-173.
JIANG W, ZHANG G, ZHANG L, et al. Effects of Chinese medicinal materials addition on quality of Green-covering Guanyin Tuqu and correlation analysis[J]. China Brewing, 2024, 43(1): 169-173.
- [11] 刘小改,王小伟,张坤.清香型白酒大曲酯化力测定方法的优化研究[J].中国酿造,2021,40(11):184-187.
LIU X G, WANG X W, ZHANG K. Optimization of the measurement method for the esterification ability of light-flavor Baijiu Daqu[J]. China Brewing, 2021, 40(11): 184-187.
- [12] 孙羊羊,尹亚格,吴雨蕊,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.
- [13] WANG J, ZHONG Q P, YANG Y Y, et al. Comparison of bacterial diversity between two traditional starters and the round-koji-maker starter for traditional Cantonese Chi-flavor liquor brewing[J]. Frontiers in Microbiology, 2018, 9: 1 053.
- [14] 宁亚丽,吴跃,何婧,等.基于高通量测序技术分析朝鲜族传统米酒及其酒曲中微生物群落多样性[J].食品科学,2019,40(16):107-114.
NING Y L, WU Y, HE Q, et al. Analysis of microbial community diversity in Chinese Korean traditional rice wine and its starter culture using high-throughput sequencing[J]. Food Science, 2019, 40(16): 107-114.
- [15] ZHAO C, SU W, MU Y, et al. Integrative metagenomics-metabolomics for analyzing the relationship between microorganisms and non-volatile profiles of traditional Xiaoqu [J]. Frontiers in Microbiology, 2021, 11: 617030.
- [16] 朱治宇.茅台镇酱香型白酒酿造区域霉菌多样性特征研究[D].贵阳:贵州大学,2020:1-68.
ZHU Z Y. Study on the characteristics of mold diversity in Maotai town sauce-flavor liquor brewing area[D]. Guiyang:

- Guizhou University, 2020: 1-68.
- [17] 苏凤, 卫春会, 曾波, 等. 中高温大曲中红曲霉的筛选及应用[J]. 食品与机械, 2024, 40(5): 203-209.
SU F, WEI C H, ZENG B, et al. Screening and application of *Monascus* in medium and high temperature Daqu[J]. Food & Machinery, 2024, 40(5): 203-209.
- [18] 朱丽萍, 杨强, 江威, 等. 清香型小曲白酒霉菌菌群解析与酶活特性研究[J]. 食品与发酵工业, 2022, 48(7): 70-77.
ZHU L P, YANG Q, JIANG W, et al. Mold communities and enzyme activity characteristics in light-flavor Xiaoqu Baijiu[J]. Food and Fermentation Industries, 2022, 48(7): 70-77.
- [19] 黄科屹, 邓杰, 卫春会, 等. 源于中高温大曲的米根霉制备米曲工艺优化及应用[J]. 食品与机械, 2022, 38(9): 185-190.
HUANG K Y, DE J, WEI C H, et al. Optimization and application of Miqu prepared by *Rhizopus oryzae* from medium-high temperature Daqu[J]. Food & Machinery, 2022, 38(9): 185-190.
- [20] ZHAO C, SU W, MU Y C, et al. Effects of Jiuqu inoculating *Rhizopus oryzae* Q303 and *Saccharomyces cerevisiae* on chemical components and microbiota during black glutinous rice wine fermentation[J]. International Journal of Food Microbiology, 2023, 385: 110012.
- [21] ZHAO C, SU W, MU Y C, et al. Correlations between microbiota with physicochemical properties and volatile flavor components in black glutinous rice wine fermentation[J]. Food Research International, 2020, 138: 109800.
- [22] HU Y L, LEI X Y, ZHANG X M, et al. Characteristics of the microbial community in the production of Chinese rice-flavor Baijiu and comparisons with the microflora of other flavors of Baijiu[J]. Frontiers in Microbiology, 2021, 12: 673670.
- [23] WANG D Q, CHEN L Q, YANG F, et al. *Yeasts* and their importance to the flavour of traditional Chinese liquor: a review[J]. Journal of the Institute of Brewing, 2019, 125(2): 214-221.
- [24] 郑自强, 卫春会, 邓杰, 等. 一株产纤维素酶枯草芽孢杆菌的麸曲制作及其产酶特性研究[J]. 食品与机械, 2021, 37(10): 12-17.
ZHENG Z Q, WEI C H, DE J, et al. Study on the production of Fuqu and the characteristics of enzyme about a cellulase producing *Bacillus subtilis*[J]. Food & Machinery, 2021, 37(10): 12-17.
- [25] DONG W W, YANG Q, LIAO Y X, et al. Characterisation and comparison of the microflora of traditional and pure culture Xiaoqu during the Baijiu liquor brewing process[J]. Journal of the Institute of Brewing, 2020, 126(2): 213-220.
- [26] 侯强川, 王玉荣, 田龙新, 等. 基于宏基因组测序技术解析市售强化酒曲微生物群落结构和功能特征[J]. 食品与发酵工业, 2023, 49(10): 100-107.
HOU Q C, WANG Y R, TIAN L X, et al. Microbial community structure and functional characteristics of commercial intensified Jiuqu based on metagenomic sequencing technology[J]. Food and Fermentation Industries, 2023, 49(10): 100-107.
- [27] WANG Q, WANG C Y, XIANG X Q, et al. Analysis of microbial diversity and succession during Xiaoqu Baijiu fermentation using high-throughput sequencing technology[J]. Engineering in Life Sciences, 2022, 22(7): 495-504.
- [28] 唐佳代, 邱树毅, 王春晓, 等. 贵州地区酿酒小曲细菌多样性比较分析[J]. 中国酿造, 2019, 38(10): 55-59.
TANG J D, QIU S Y, WANG C X, et al. Comparison and analysis of bacterial diversity of brewing Xiaoqu in Guizhou[J]. China Brewing, 2019, 38(10): 55-59.
- [29] JIANG L, SU W, MU Y C, et al. Major metabolites and microbial community of fermented black glutinous rice wine with different starters[J]. Frontiers in Microbiology, 2020, 11: 593.
- [30] 冯方剑, 唐维川, 杨官荣, 等. 不同产区酱香型大曲理化指标及风味成分的研究[J]. 酿酒, 2023, 50(5): 29-36.
FENG F J, TANG W C, YANG G R, et al. Research on flavor component and physical index for high temperature Daqu[J]. Liquor Making, 2023, 50(5): 29-36.
- [31] 王宇良, 李志溥, 苏泽佳, 等. 制曲方式对豉香型白酒酒曲理化因子及细菌群落的影响[J]. 食品科学, 2023, 44(22): 211-217.
WANG Y L, LI Z P, SU Z J, et al. Effect of preparation methods on the physicochemical properties and bacterial community of Chixiangxing Baijiu Qu[J]. Food Science, 2023, 44(22): 211-217.
- [32] 皇甫洁, 何猛超, 刘雅, 等. 米香型白酒中不同制曲工艺的微生物群落结构差异分析[J]. 酿酒科技, 2023(10): 17-21.
HUANG F J, HE M C, LIU Y, et al. Difference in microbial community structure of Mixiang Xiaoqu by different production technology[J]. Liquor-Making Science & Technology, 2023(10): 17-21.
- [33] 卜光明, 周化斌, 周茂洪, 等. 酿造酒中非酿酒酵母的研究进展[J]. 食品工业科技, 2019, 40(14): 346-352.
BU G M, ZHOU H B, ZHOU M H, et al. Research progress on the *non-saccharomyces* in the brewing wine fermentation[J]. Science and Technology of Food Industry, 2019, 40(14): 346-352.
- [34] 吴正坤, 刘蒲临, 杨团元, 等. 不同贮存期高温大曲微生物群落演替与理化指标相关性分析[J]. 中国酿造, 2023, 42(7): 160-166.
WU Z K, LIU P L, YANG T Y, et al. Correlation analysis of microbial community succession and physicochemical properties of Daqu in different storage periods[J]. China Brewing, 2023, 42(7): 160-166.