

## 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

李艳婷<sup>1</sup>, 郭尚<sup>1\*</sup>, 郭霄飞<sup>1</sup>, 郭伟伟<sup>1</sup>, 李国文<sup>2</sup>, 徐莉娜<sup>1</sup>

<sup>1</sup>山西农业大学 山西功能食品研究院 太原 030031

<sup>2</sup>汾阳市杏花村镇晋裕白酒公司 山西汾阳 032200)

**摘要** 为了更好地了解清香型白酒的酿造机理,分析传统清香型白酒发酵过程中微生物群落结构、演替规律及与理化性质的相关性,采用传统地缸发酵 28 d,连续取样(第 0,2,4,6,8,12,16,20,24,28 天)获得 10 组清香型白酒酒醅样品,分别测定其真菌、细菌组成以及水分含量、酸度、pH 值、淀粉含量等理化性质。结果表明:从清香型白酒酒醅样品中检出细菌分布在 18 个门,其中真菌分布在 7 个门;属水平分析共获得 467 个属,其中细菌属 311 个,主要包括乳酸菌属、小球菌属、明串珠菌属、魏斯氏菌属、泛菌属、阿克曼菌属、肥杆菌属、链球菌属等,乳酸菌属和小球菌属为优势菌属;真菌属 156 个,主要包括哈萨克酵母属、酵母属、库玛氏菌属、嗜热子囊菌属、曲霉属、威克汉姆酵母属等,其中哈萨克酵母属和酵母属为优势菌属,且在同一时期不同的发酵缸内微生物组成略有差异。对样品的微生物多样性与理化性质进行相关性分析表明:细菌群落的多样性与发酵温度和 pH 值呈极显著的正相关,与水分和酒度呈极显著的负相关;比较而言,酒醅真菌群落的多样性与各理化指标之间的相关性均不显著。

**关键词** 清香型白酒;高通量测序技术;理化指标;微生物多样性;相关性分析

**文章编号** 1009-7848(2023)05-0330-11 **DOI:** 10.16429/j.1009-7848.2023.05.033

据古碑文记载:“清香型白酒,产于山西省汾阳县杏花村,距今已有 1 400 余年的历史”,唐代杜牧的《清明》中写道:“借问酒家何处有?牧童遥指杏花村”。清香型白酒主要采用大麦和豌豆制曲,以高粱为基底酿造,清蒸清烧,地缸式发酵,发酵完全后进行贮存、勾兑、包装。清香型白酒成品“入口绵,落口甜,清香不冲鼻,饮后有余香”<sup>[1]</sup>。作为清香型白酒的代表,汾酒在 1916 年巴拿马万国博览会上曾荣获一等优胜金质奖章,1952 年在我国第一届全国评酒会上荣获全国名酒称号。目前,对于清香型白酒的研究主要集中在发酵用高粱品种的筛选,大曲的培养,发酵工艺的研究,发酵过程中酒醅微生物组成与化学成分的分析,酒体的香气成分和酒体的陈酿行为等。然而,领域内尚未报道利用高通量测序技术对清香型白酒酿造过程中酒醅真菌、细菌微生物群落结构、演替以及与其理化性质相关性的研究。

高通量测序技术(High-throughput sequencing)是以 454 焦磷酸测序、Illumina (Solexa) Se-

quencing 和 ABI SOLiD sequencing 为代表的第二代测序技术(或称为下一代测序技术)<sup>[2]</sup>,测序耗时短,成本低,重复性良好,应用广泛。在中国知网以“高通量测序技术”为主题词,共检索到学术期刊类论文 1.79 万篇,学位论文 459 篇,中国专利 208 项,海外专利 270 项,成果 35 项,主要应用于土壤、空气等<sup>[3-6]</sup>环境微生物的测定,酱、腐乳、香肠<sup>[7-9]</sup>等食品中微生物组成的鉴定,癌症、胃肠道、新冠肺炎<sup>[10-11]</sup>等疾病的诊断。高通量测序技术同样也应用于白酒发酵过程中微生物的群落结构的分析,且技术较为成熟与准确。如唐贤华<sup>[12]</sup>、罗方雯<sup>[13]</sup>、胡晓龙等<sup>[14]</sup>、胡申才等<sup>[15]</sup>、贾丽艳等<sup>[16]</sup>、王雪山等<sup>[17]</sup>采用该项技术研究了酱香型、浓香型和清香型白酒发酵酒醅中微生物的组成及群落结构的变化。

本研究以清香型白酒为研究对象,采用高通量测序技术分析不同发酵时间的酒醅中微生物群落的组成,细菌、真菌微生物群落多样性以及与其理化性质的相关性,为明确清香型白酒的酿造机理提供科学依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

酒醅样品于 2020 年 12 月-2021 年 1 月取自

收稿日期:2022-05-02

基金项目:山西省重点研发计划项目(201803D221009-2)

第一作者:李艳婷,女,硕士,助理研究员

通信作者:郭尚 E-mail:gs0351@sohu.com

汾阳市某清香型白酒厂车间,分别按大楂发酵 0, 2, 4, 6, 8, 12, 16, 20, 24, 28 d 跟踪取样 10 次, 每次选 3 个缸作为重复。用取样器分别在缸内取上、中、下层酒醅, 将 3 层样品进行混合, 部分用于测定理化指标, 部分置于 2 mL 冻存管内, 液氮速冻 2~3 min, 放于-80 °C 冰箱保存备用。

甲基红、3,5-二硝基水杨酸, 上海源叶生物; DP812 基因组 DNA 提取试剂盒, 天根生化科技(北京)有限公司; KOD FX Neo (TOYOBO), 北京百灵克生物科技有限责任公司; TransStart FastPfu Fly DNA Polymerase, 北京全式金生物技术有限公司; TE 缓冲液 (PH 8.0)、琼脂糖 (西班牙)、EDTA 二钠、乙酸(冰醋酸); 北京博美富鑫科技有限公司; EB (红色荧光核酸染料); 青岛拓邦生物科技有限公司; 100 bp DNA Ladder Marker, 北京六合通经贸有限公司。

## 1.2 仪器与设备

TU-1810 紫外-可见分光光度计, 北京普析通用仪器有限公司; 台式高速冷冻离心机, 盐城市安信实验仪器有限公司; MS104TS 电子天平, 瑞士梅特勒托利多公司; synergy HTX 型酶标仪, 基因有限公司; 9902 梯度基因扩增仪, 德国赛默飞公司; BE-1100 四维旋转混匀仪, 海门市其林贝尔仪器制造有限公司; 3-16P 24 孔离心机, 德国 Sartorius 公司。

## 1.3 方法

1.3.1 酿酒工艺流程 清香型白酒酿造工艺流程见图 1。

1.3.2 酒醅理化指标测定 水分采用恒温干燥法进行测定<sup>[18]</sup>; 酸度、酒精度、pH 值均采用沈怡芳<sup>[1]</sup>报道的方法进行测定; 淀粉采用 DNS 法进行测定<sup>[1]</sup>。

1.3.3 酒醅微生物多样性测定 提取酒醅样品总 DNA、进行 PCR 扩增、纯化, 在 IlluminaHiSeq 2500 测序平台, 采用双末端测序 (Paired-end) 方法, 构建小片段文库进行细菌 (16S rRNA V3-V4 区) 和真菌 (ITS1 区) 序列分析。通过 Reads 拼接、过滤、OTU 聚类, 物种注释及丰度分析, 揭示样品的微生物组成; 进一步进行微生物群落的  $\alpha$ -多样性分析 (Alpha-Diversity)、组间群落显著性差异分析、相关性分析。高通量测序由北京百迈客生

表 1 样品编号

Table 1 The number of samples	
发酵时间/d	样品编号
0	CK001
0	CK002
0	CK003
2	CK021
2	CK022
2	CK023
4	CK041
4	CK042
4	CK043
6	CK061
6	CK062
6	CK063
8	CK081
8	CK082
8	CK083
12	CK121
12	CK122
12	CK123
16	CK161
16	CK162
16	CK163
20	CK201
20	CK202
20	CK203
24	CK241
24	CK242
24	CK243
28	CK281
28	CK282
28	CK283

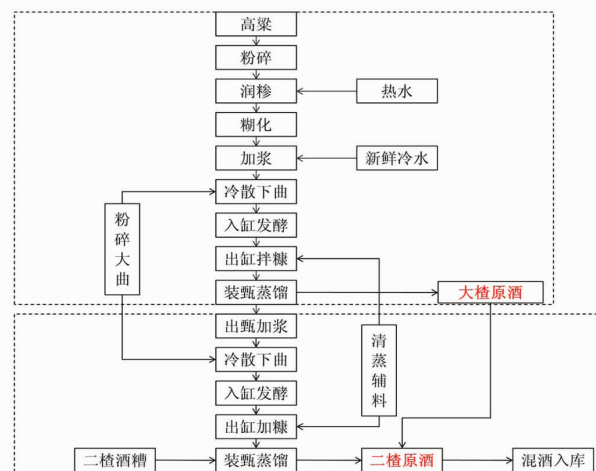


图 1 清香型白酒酿造工艺流程图

Fig.1 The flowchart on the brewing process of the mild flavour baijiu

物科技有限公司完成。

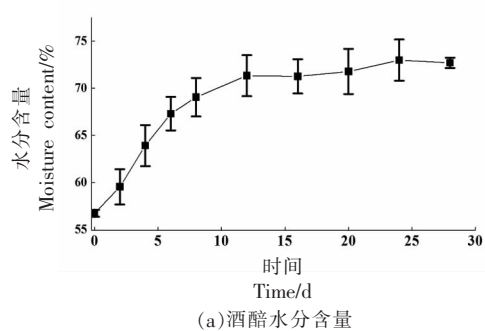
#### 1.4 数据处理

使用 Usearch 软件<sup>[19]</sup>对 Reads 在 97.0% 的相似度水平下进行聚类分析,以 UNITE 为参考数据库对真菌特征序列进行分类学注释,以 SILVA 为参考数据库对细菌特征序列进行分类学注释,利用 QIIME 软件生成门和属水平上的物种丰度矩阵。使用 QIIME2 软件,对样品  $\alpha$ -多样性指数进行评估。清香型白酒酒醅理化指标用 Excel 进行数据分析及绘图。微生物多样性与理化指标的相关性用 SPSS Statistics 17.0 及 Excel 进行分析。

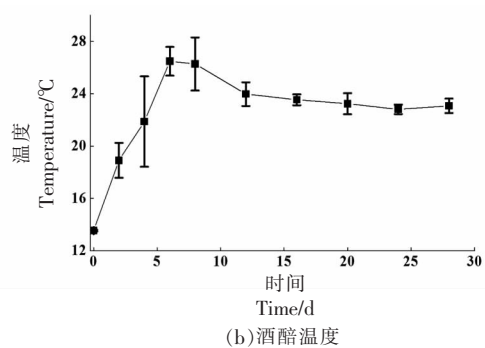
## 2 结果与分析

### 2.1 酒醅发酵过程中的理化指标分析

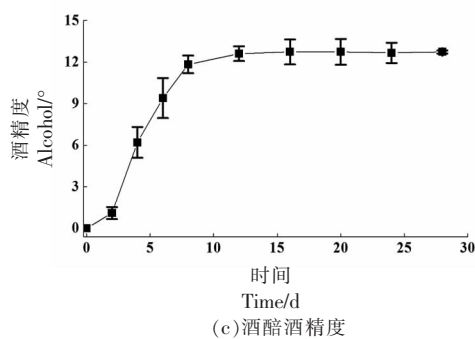
由图 2a 可知,试验所选 10 份清香型白酒发酵酒醅样品中,其水分含量随时间的延长呈逐渐上升的趋势。发酵前 12 d,水分持续升高,从 56.73% 增至 71.35%;发酵中后期,水分缓慢增加,逐渐达到平稳,同一时间点内样品间差异不显著。发酵过程中的水分变化主要源于样品中微生物的代谢。由图 2b 可知,发酵期间酒醅的温度呈“前缓升、中挺、后缓落”的趋势。这可能与酒醅入缸温度比较低(13.53 °C)有关;发酵第 6 天时,酒醅温度达到最高值 26.27 °C,后逐渐降低达到平稳(23 °C)



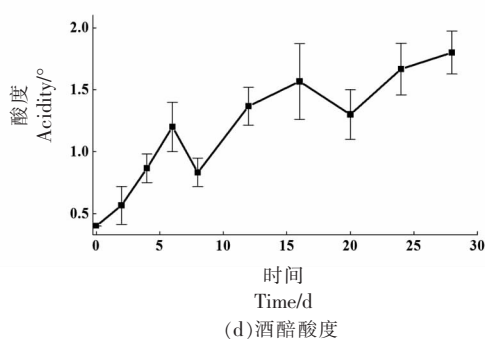
(a) 酒醅水分含量



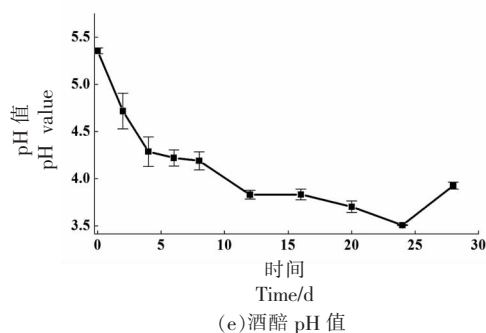
(b) 酒醅温度



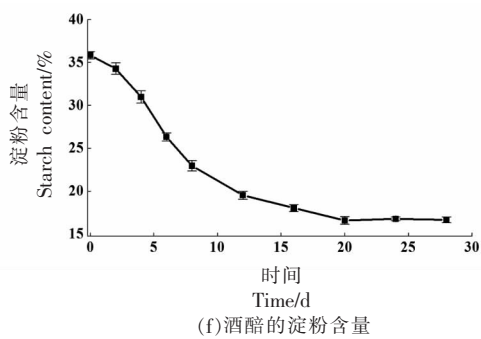
(c) 酒醅酒精度



(d) 酒醅酸度



(e) 酒醅 pH 值



(f) 酒醅的淀粉含量

图 2 清香型白酒发酵过程中酒醅理化指标的变化

Fig.2 Changes of physicochemical indexes in fermented substrates during fermentation

左右)。由图 2c 可知,清香型白酒酒醅的酒精度在发酵前中期急剧上升,发酵 16 d 时达到最大值 12.73°,发酵中期至发酵结束保持稳定状态。由图 2d 可知,酸度逐渐升高,从 0.4 升至 1.8。由图 2e 可知,随着发酵的进行,清香型白酒酒醅的 pH 值整体呈下降趋势,从 5.34 降至 3.93;由图 2f 可知,酒醅中的淀粉含量随发酵时间的延长呈逐渐下降的趋势,由入缸时的 35.85%降至发酵结束时的 16.65%。

发酵开始时酒醅中淀粉含量较高,在微生物的作用下,淀粉酶水解淀粉时会产生大量的热量,同时糖化作用副产大量水分,陶缸又无渗漏,因此都集存于酒醅内,导致酒醅水分含量升高。水分的增长多少与生成酒精成正比。淀粉逐渐减少,与酒精生成呈反比关系。发酵中后期,两者水平趋于稳定状态。酸度除在发酵中期,由于酵母菌旺盛发酵产酒时升幅较小外,在入缸初始及发酵后期均呈快速增长的趋势。

## 2.2 $\alpha$ -多样性分析

物种  $\alpha$ -多样性主要反映了单个样品中的物种丰度(Richness)及物种多样性(Diversity),其衡量指标包括:Chao1、Ace、Shannon、Simpson、覆盖率指数等。Chao1 指数主要衡量物种丰度即物种

数量的多少。Shannon 指数用于衡量物种多样性,受样品群落中物种丰度和物种均匀度(Community evenness)的影响。相同物种丰度的情况下,群落中各物种具有越大的均匀度,则认为群落具有越大的多样性,Shannon 指数值越大,说明样品的物种多样性越高<sup>[20]</sup>。另本研究还统计了微生物物种的覆盖率(Coverage),其数值越高,则样本中物种被测出的概率越高,而没有被测出的概率越低。由表 2 可知,清香型白酒发酵过程中,各酒醅中微生物序列的覆盖率达到 99.89%以上,由此看来样品中的微生物种类几乎均被检测到,该测序深度已经基本覆盖到样品中所有的物生物物种。经分析,酒醅中的细菌 OUT 数量为 375~652 之间,真菌 OUT 数量为 119~243,说明在酒醅发酵过程中,细菌的复杂程度高于真菌。随着发酵时间的延长,酒醅中细菌的 Shannon 指数逐渐降低,而真菌的 Shannon 指数呈波动降低趋势,由此看来,样品中细菌群落随发酵时间的延长呈降低趋势,而真菌群落则在波动中逐渐升高;酒醅中细菌的 Chao1 指数呈先降低后升高的趋势,而真菌的 Chao1 指数则呈降低(0~6 d)→升高(6~24 d)→降低(24~28 d)的趋势,表明在酒醅的发酵过程中,真菌和细菌群落丰度在不断变化。

表 2  $\alpha$ -多样性分析

Table 2 Microbial  $\alpha$ -diversity of samples

样品	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
CK001	635	642.09	7.42	0.9997	145	191.20	2.25	0.9997
CK002	652	655.75	7.72	0.9998	192	228.25	1.17	0.9996
CK003	631	659.25	8.06	0.9997	168	198.60	2.15	0.9998
CK021	521	550.70	4.18	0.9992	154	164.93	1.95	0.9998
CK022	537	557.04	4.15	0.9995	144	186.00	1.94	0.9996
CK023	497	537.69	4.13	0.9991	128	162.50	1.99	0.9997
CK041	442	495.00	4.42	0.9993	225	246.00	2.69	0.9996
CK042	375	405.94	4.00	0.9993	134	141.09	2.72	0.9998
CK043	440	502.31	3.94	0.9989	143	164.11	2.44	0.9997
CK061	405	438.73	4.05	0.9992	136	161.09	2.35	0.9997
CK062	426	475.85	4.02	0.9989	124	135.18	2.04	0.9997
CK063	396	426.49	4.22	0.9994	133	138.08	2.23	0.9998
CK081	409	458.76	4.01	0.9992	147	164.77	2.38	0.9997
CK082	399	440.05	4.09	0.9995	145	172.27	2.10	0.9997
CK083	421	442.67	4.19	0.9995	133	166.33	2.41	0.9997
CK121	455	505.90	2.33	0.9989	174	189.60	3.44	0.9998
CK122	443	496.17	1.42	0.9989	138	243.00	2.57	0.9997

(续表 2)

样品	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
CK123	472	526.00	1.87	0.9989	143	170.14	2.71	0.9997
CK161	433	480.27	2.69	0.9991	119	149.00	2.64	0.9998
CK162	438	496.40	2.89	0.9990	137	167.60	2.68	0.9998
CK163	438	482.63	3.03	0.9992	151	185.00	2.65	0.9998
CK201	418	446.00	2.21	0.9993	132	147.17	2.03	0.9998
CK202	426	539.82	1.47	0.9984	152	194.75	3.17	0.9997
CK203	428	451.61	2.42	0.9993	157	183.25	2.48	0.9997
CK241	493	557.57	3.33	0.9992	243	250.86	4.91	0.9998
CK242	481	523.56	2.77	0.9990	144	204.00	3.16	0.9997
CK243	484	529.18	2.80	0.9990	187	269.33	4.24	0.9995
CK281	514	534.52	3.22	0.9995	150	177.14	4.39	0.9997
CK282	510	551.13	3.10	0.9993	151	219.00	3.47	0.9998
CK283	516	545.57	2.92	0.9993	137	161.43	2.12	0.9997

### 2.3 微生物组成分析

通过测序,从清香型白酒酒醅样品中获得来自 18 个属和未知分类单元的细菌,如图 3 所示,主要优势菌来自厚壁菌门(Firmicutes)、变形菌门(Proteobacteria)、拟杆菌门(Bacteroidetes)、放线菌门(Actinobacteria)、酸杆菌门(Acidobacteria)、疣微菌门(Verrucomicrobia)、蓝细菌门(Cyanobacteria)等,且各门相对丰度随发酵过程的推进出现变化。发酵前,变形菌门、拟杆菌门、厚壁菌门、放线菌门、酸杆菌门和疣微菌门是主要的优势菌门,优势菌门中除后壁菌门的物种丰度随发酵时间推移出现上升趋势,并在发酵 2 d 后成为第一优势菌门,其余优势菌门比例均在发酵开始后出现下降,并在发酵中期降到最低,发酵后期出现小幅回升。贾丽艳等<sup>[21]</sup>研究了在传统清香型白酒发酵酒醅中,厚壁菌门和变形菌门为大楂发酵阶段的优势菌群,并呈动态变化趋势;王雪山等<sup>[17]</sup>和 Li 等<sup>[22]</sup>认为清香型白酒酒醅的细菌种群主要包括厚壁菌门和变形菌门,这些结果不仅与本研究结果一致,同时也是酱香型白酒<sup>[23]</sup>、浓香型白酒<sup>[24]</sup>与凤香型白酒<sup>[25]</sup>发酵过程中的主要细菌种类。雷振河<sup>[26]</sup>分析了酿造清香型白酒所用大曲的细菌组成,结果表明厚壁菌门、变形菌门、放线菌门和酸杆菌门为主要优势菌门,推测酒醅中的优势细菌种群主要来自大曲,还有少量来自环境。

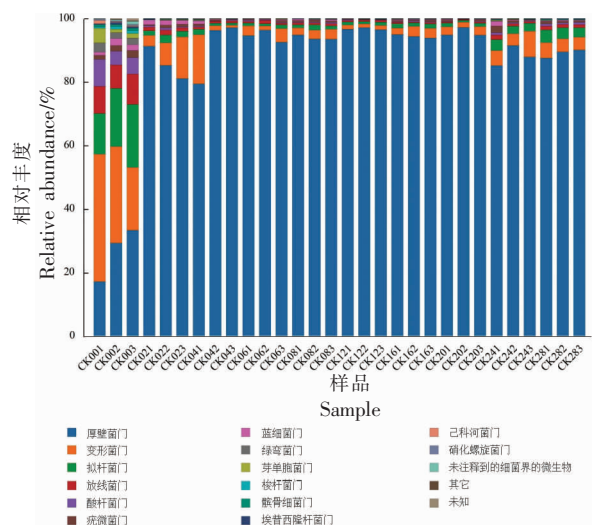


图 3 门水平下细菌群落结构组成分布

Fig.3 Distribution of bacterial community structure at phylum level

清香型白酒酒醅在整个发酵过程中,鉴定出的真菌分布在 7 个门和未知分类单元,其中子囊菌门(Ascomycota)为绝对优势种群,相对丰度达到 89.78%~98.77%,其次分别为担子菌门(Basidiomycota)、被孢霉门(Mortierellomycota)、黏孢子菌门(Mucoromycota)、壶菌门(Chytridiomycota)、罗兹菌门(Rozellomycota)和油壶菌门(Olpidiomycota),其丰度分别为 2.6%,0.41%,0.18%,0.04%和 0.002%。其中,酒醅发酵 0,24,28 d 时,即酒醅发

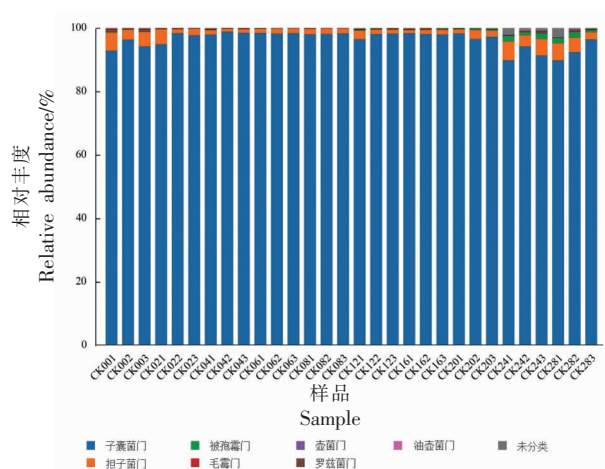


图 4 门水平下真菌群落结构组成分析

Fig.4 Distribution of fungal community structure at phylum level

酵初始和发酵后期,子囊菌所占比例最低,整体呈先升后降的趋势;而担子菌所占真菌种群比例则呈先降后升的趋势。贾丽艳等<sup>[6]</sup>、王雪山等<sup>[7]</sup>同样认为子囊菌门在清香型白酒发酵中占主导地位。

在清香型白酒发酵酒醅中,共检测到来自 311 个属的细菌,显著高于王雪山等<sup>[7]</sup>的试验结果(161 个属)。如图 5 所示,主要存在 20 个细菌类群,分别为乳酸菌属 (*Lactobacillus*)、小球菌属 (*Pediococcus*)、明串珠菌属 (*Leuconostoc*)、魏斯氏菌属 (*Weissella*)、泛菌属 (*Pantoea*)、阿克曼氏菌 (*Akkermansia*)、肥杆菌属 (*Obesumbacterium*)、链球菌属 (*Streptococcus*)、单胞菌属 (*Sphingomonas*)、拟杆菌属 (*Bacteroides*)、双歧杆菌属 (*Bifidobacterium*)、葡萄球菌属 (*Staphylococcus*)、埃希氏菌-志贺菌属 (*Eschericia-Shigella*) 等。

发酵前酒醅中菌群多样性较高,优势菌属来自明串珠菌属、泛菌属、乳杆菌属、链球菌属、魏斯氏菌属等,发酵过程中主要优势菌群以乳杆菌属、小球菌属、明串珠菌属、魏斯氏菌属、泛菌属为主。贾丽艳等<sup>[21]</sup>研究表明,大楂酒醅中主要细菌菌属为乳杆菌属、片球菌属、葡萄球菌属、浮霉状菌属、乳球菌属、明串珠菌属、魏斯氏菌属和其它未分类菌。王雪山等<sup>[7]</sup>研究发现大楂酒醅中优势细菌属分别为乳杆菌属、魏斯氏菌属、*Kroppenstedtia*、假单胞菌属、明串珠菌属、芽孢杆菌属及片球菌属。其中,乳杆菌属、片球菌属、魏斯氏菌属均为共同的优势菌属,其它菌属略有差异,推测可能由于

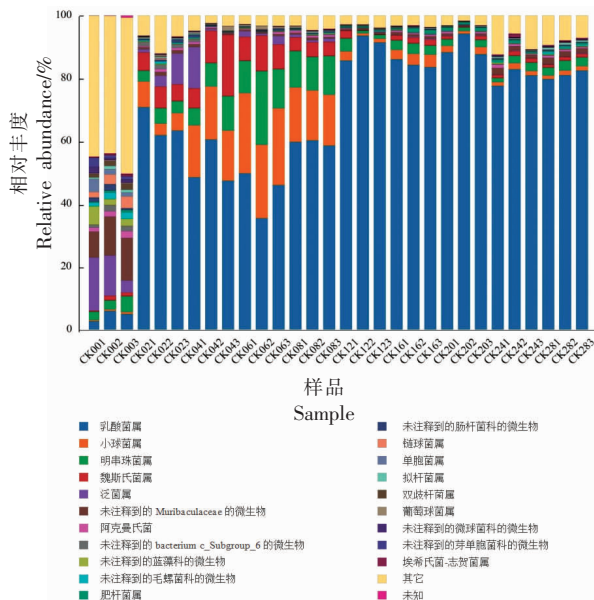


图 5 属水平下细菌群落结构组成分析

Fig.5 Distribution of bacterial community structure at genus level

酿造用大曲与发酵场所不同,导致出发菌株与环境微生物的组成差异影响了发酵过程中的酒醅细菌结构组成,且同一发酵场所同一时间段的不同发酵地缸内或同一地缸内的不同取样点酒醅其细菌组成也有差异。随着发酵进行,乳酸菌属成为第一优势菌属,相对丰度从 2.58% 上升至 94.17%,发酵前期急剧上升,在发酵 12 d 时相对丰度达到 80% 左右,随后保持平稳。小球菌属相对丰度在发酵前期逐渐升高,从 0.37% 升至 25.58% (发酵第 6 天),后逐渐下降,保持较低的水平,发酵第 28 天时降至 1.13%。明串珠菌属相对丰度为 0.8%~23.44%,其变化趋势与小球菌属相似,在发酵前期逐渐升高,从 0.8% 升至 23.44% (发酵第 6 天),后逐渐下降,保持在 0.2%~0.3% 之间。魏斯氏菌属相对丰度为 0.35%~19.56%,同样在发酵前期逐渐升高,然后逐渐降低。泛菌属相对丰度为 0.09%~16.89%,在整个发酵过程,随着时间的延长呈下降趋势,发酵 0 d 时相对丰度为 11.14%,发酵第 12 天降至最低值 0.08%,而后略有回升,又持续下降,发酵 28 d 时降至 0.17%。

在清香型白酒酒醅发酵过程中,共检测到来自 156 个属的真菌微生物,如图 6 所示,主要存在 21 个真菌类群,分别是哈萨克酵母属 (*Kazachsta*

nia)、酵母属(*Saccharomyces*)、库玛氏菌属(*Kurtzmaniella*)、嗜热子囊菌属(*Thermoascus*)、曲霉属(*Aspergillus*)、威克汉姆酵母属(*Wickerhamomyces*)、有孢圆酵母(*Torulasporea*)、毛孢子菌属(*Trichosporon*)、链格孢属(*Alternaria*)、链孢菌属(*Fusarium*)、被孢霉菌属(*Mortierella*)、分子孢子菌属(*Cladosporium*)、篮状菌属(*Talaromyces*)、黑孢属(*Nigrospora*)、青霉菌(*Penicillium*)、毛葡萄属(*Botryotrichum*)、长西氏酵母(*Naganishia*)、*Saitozyma*、汉逊属(*Hanseniaspora*)、*Triangularia*。

发酵过程中的主要优势菌群为哈萨克酵母属、酵母属、库玛氏菌属、嗜热子囊菌属、曲霉属、威克汉姆酵母、有孢圆酵母、毛孢子菌属、链格孢属、链孢菌属。其中哈萨克酵母属和酵母属是已知分类信息中主要的优势菌属。哈萨克酵母属相对丰度为 0.12%~41.7%，在发酵前期迅速繁殖，在发酵第 8 天相对丰度达到最大值 33.91%(平均值)，随后持续降低，发酵第 28 天降至 1.64%；酵母属的相对丰度为 0.07%~21.75%，发酵前中期持续升高，产酒精能力最强的酵母菌属内物种入缸后急速繁殖，成为酒醅中进行发酵产酒的主要菌之一。发酵第 16 天达到最大值 19.82%(平均值)，随后逐渐降低，在发酵结束时保持在 5%左右。雷振河<sup>[26]</sup>认为，清香型白酒酿造大曲的优势真核微生物包括曲霉属、嗜热子囊菌属、根霉菌属等，其中曲霉属和根霉菌属主要作用于发酵前期的糖化作用，与本研究酒醅发酵前期的优势真菌菌群有一定差异，推测可能是大曲的生产地点与贮存时间不同引起的。

2.4 微生物群落与理化指标的相关性分析

对清香型白酒酒醅细菌、真菌多样性与其理

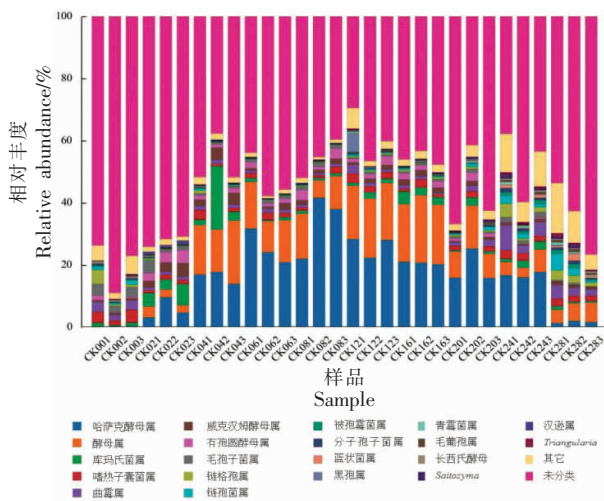


图 6 属水平下真菌群落结构组成分析

Fig.6 Distribution of fungal community structure at genus level

化指标(温度、水分、酸度、pH 值、淀粉含量)进行相关性分析,结果如表 3 所示。酒醅细菌多样性与发酵温度呈极显著正相关性( $r=0.855$ ),与水分和酒度呈极显著负相关,相关系数分别为-0.565和-0.626;与 pH 值呈极显著的正相关性( $r=0.653$ ),与淀粉含量呈显著正相关。清香型白酒酒醅真菌多样性与各理化指标之间相关性均不显著。陈雪等<sup>[25]</sup>报道凤香型白酒酒醅的理化指标与真菌多样性之间相关性不显著,与本试验结果一致。

RDA (Redundancy analysis)/CCA (Canonical Correspondence analysis)<sup>[22]</sup> 是基于对应分析发展的一种排序方法,RDA 分析基于线性模型,CCA 分析基于单峰模型,主要用来反映菌群或样品与环境因子之间的关系。根据物种分布变化,选择最佳的分析模型。本研究选用 RDA 模型。

表 3 酒醅微生物多样性与理化指标的相关性

Table 3 The correlation of microbial diversity with physicochemical properties in fermented grain samples

指标	温度	水分	酒度	酸度	pH 值	淀粉
细菌	0.855**	-0.565**	-0.626**	-0.346	0.653**	0.449*
真菌	-0.350	-0.133	-0.089	0.032	0.030	0.036

注:\* 显著相关( $P<0.05$ );\*\* 极显著相关( $P<0.01$ )。

清香型白酒酒醅中主要的细菌菌属与其理化指标的相关性分析如图 6a 所示。随着发酵的进行,酒醅中乳酸菌属的变化趋势与酸度呈极显著的正相关性,相关系数为 0.787,与水分呈显著的

正相关性( $r=0.724$ );与淀粉含量呈显著的负相关性( $r=-0.742$ ),与 pH 值呈显著的负相关性( $r=-0.787$ )。泛菌属的变化趋势与酒醅酸度、水分含量和酒度均呈极显著的负相关性,相关系数分

别为-0.672,-0.708,-0.664,与淀粉含量和 pH 值均呈极显著的正相关性,相关系数分别为 0.694 和 0.738。葡萄球菌属与酒醅 pH 值呈极显著的正相关性( $r=0.731$ )。

清香型白酒酒醅中主要的真菌微生物属水平种类与其理化指标的相关性分析如图 6b 所示。随着白酒酒醅的发酵,其中所含的哈萨克酵母属和酵母属与发酵温度之间存在显著的正相关性,相关系数分别为 0.77 与 0.517,与酒度、酸度与水分之间存在一定的正相关性。*Trichosporon* 与酒醅酸度呈正相关性( $r=0.56$ )。毛葡萄属与酒醅酸度之间存在显著的正相关性( $r=0.635$ ),与淀粉含量之间存在负相关性( $r=-0.655$ )。

综上所述,在发酵初期,酒醅中淀粉含量高,含氧量大,在此期间酵母菌大量繁殖,产生大量的  $\text{CO}_2$  和热量,酸度升高,温度升高,pH 值升高,淀粉含量降低,同时由于发酵温度升高,大曲直接带

入的淀粉酶酶活提高,在淀粉酶的作用下淀粉含量显著降低。随着酒醅中氧气耗尽,酵母菌进入无菌发酵产酒精的阶段,酵母菌由酒化酶作用于葡萄糖生成酒精,细菌由 ED 途径将葡萄糖发酵成酒精。淀粉分解利用的速率明显降低。随着酒醅 pH 值和酒精度的升高,酒精发酵迟缓,最后趋于停止,这可能是因为发酵后期酵母菌逐渐衰老或死亡,导致酒精发酵延缓或者停止,因此酒醅中的酒精含量增长甚微,甚至略有下降。除此之外,酵母菌发酵产生酒精的同时也会生成部分甘油,而霉菌能产甘露醇,某些细菌在有氧条件下也产甘油,乳杆菌属可产生 2,3-丁二醇。多元醇虽属不挥发醇类,但在用蒸馏酒醅时会有水蒸气将其部分的带入酒中,多元醇是白酒甜味及醇厚感的重要部分。同时酒醅中的乳杆菌属等厌氧或兼性厌氧菌再生长,产生乳酸、醋酸等有机酸,酸度升高,pH 值下降。

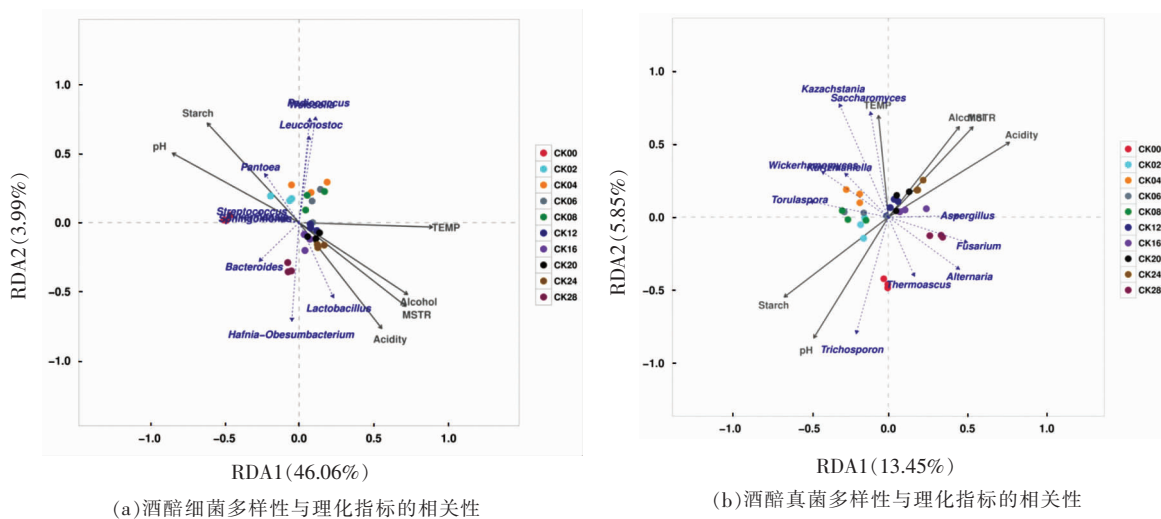


图 7 酒醅微生物多样性与理化指标的相关性

Fig.7 The correlation of microbial diversity with physicochemical properties in fermented grain samples

### 3 结论

本研究通过分析传统清香型白酒酒醅发酵过程中微生物群落结构、群落演替规律及其与理化指标的关系,更好地了解了清香型白酒的酿造机理。结果表明,清香型白酒发酵过程中共检测到的细菌分布在 18 个门,真菌分布在 7 个门,以上细菌来自 311 个属,真菌来自 156 个属,优势菌属为乳酸菌属、小球菌属、明串珠菌属、魏斯氏菌属、泛

菌属、阿克曼菌属、肥杆菌属、链球菌属、哈萨克酵母属、酵母属、库玛氏菌属、嗜热子囊菌属、曲霉属、威克汉姆酵母属等,其中乳酸菌属、小球菌属、哈萨克酵母属和酵母属占绝对优势。细菌整体多样性与发酵温度呈极显著的的正的强相关性,与水分和酒度呈极显著的负相关,与 pH 值呈极显著的正相关性,酒醅真菌整体多样性与各理化指标之间相关性均不显著。



## 参 考 文 献

- [1] 沈怡方. 白酒生产技术全书[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 2020: 332-347.
- SHEN Y F. Liquor production technology [M]. Beijing: China Light Industry Press, 2020: 332-347.
- [2] 高静, 焦雅, 张文广. 高通量测序序列比对研究综述[J]. 生命科学研究, 2014, 18(5): 458-464.
- GAO J, JIAO Y, ZHANG W G. Overview of sequence alignment for high-throughput sequencing data[J]. Life Science Research, 2014, 18(5): 458-464.
- [3] LIU H Q, LIN H Z, SONG B R, et al. Stable-isotope probing coupled with high-throughput sequencing reveals bacterial taxa capable of degrading aniline at three contaminated sites with contrasting pH[J]. The Science of the Total Environment, 2021, 771: 144807-144807.
- [4] 赵卫松, 郭庆港, 苏振贺, 等. 马铃薯健株与黄萎病株根际土壤真菌群落结构及其对碳源利用特征[J]. 中国农业科学, 2021, 54(2): 296-309.
- ZHAO W S, GUO Q G, SU Z H, et al. Characterization of fungal community structure in the rhizosphere soil of healthy and diseased-verticillium wilt potato plants and carbon source utilization[J]. Scientia Agricultura Sinica, 2021, 54(2): 296-309.
- [5] 孟玮, 高攀, 翟旭亮, 等. 利用高通量测序技术分析鱼菜共生池塘的真菌多样性和群落结构[J]. 中国海洋大学学报(自然科学版), 2021, 51(3): 45-53.
- MENG W, GAO P, ZHAI X L, et al. Analyzing fungal community diversity and structure in aquaponics ponds by high-throughput sequencing technology[J]. Periodical of Ocean University of China, 2021, 51(3): 45-53.
- [6] BESTER R, COOK G, BREYTENBACH J H J, et al. Towards the validation of high-throughput sequencing (HTS) for routine plant virus diagnostics: Measurement of variation linked to HTS detection of citrus viruses and viroids[J]. Virology Journal, 2021, 18(1): 61.
- [7] RYU J A, KIM E, YANG S M, et al. High-throughput sequencing of the microbial community associated with the physicochemical properties of meju (dried fermented soybean) and doenjang (traditional Korean fermented soybean paste)[J]. LWT, 2021, 146(1): 111473-111482.
- [8] 吕倩, 马莉, 骆巧, 等. 基于高通量测序技术分析四川两个奶牛场乳汁的菌群差异[J]. 微生物学报, 2021, 61(10): 3087-3102.
- LÜ Q, MA L, LUO Q, et al. Analysis of the differences in the microflora of milk from two dairy farms in Sichuan province based on high-throughput sequencing technology[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2021, 61(10): 3087-3102.
- [9] 王新惠, 张雅琳, 孙劲松, 等. 基于高通量测序技术分析广味香肠中细菌群落结构和演替规律[J]. 中国食品学报, 2021, 21(3): 334-340.
- WANG X H, ZHANG Y L, SUN J S, et al. Bacterial community structure and succession law in cantonese sausage based on high-throughput sequencing technology [J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2021, 21(3): 334-340.
- [10] 沈晔, 尹婷婷, 袁文博, 等. 染色体微阵列分析和低深度高通量全基因组测序技术在流产遗传学诊断中的应用[J]. 生殖医学杂志, 2021, 30(3): 313-318.
- SHEN Y, YIN T T, YUAN W B, et al. Application of chromosomal microarray analysis and copy number variation sequencing in genetic diagnosis of miscarriage [J]. Journal of Reproductive Medicine, 2021, 30(3): 313-318.
- [11] 张仪, 王增阁, 王剑. 罕见病实验室诊断技术的发展[J]. 检验医学, 2021, 36(2): 122-129, 118.
- ZHANG Y, WANG Z G, WANG J. Progress in laboratory diagnosis of rare diseases [J]. Laboratory Medicine, 2021, 36(2): 122-129, 118.
- [12] 唐贤华. 高通量测序技术初步解析浓香型白酒窖泥细菌群落结构[J]. 中国酿造, 2020, 39(1): 160-164.
- TANG X H. Preliminary analysis of bacterial community structure in strong-flavor Baijiu pit mud by high-throughput sequencing technology[J]. China Brewing, 2020, 39(1): 160-164.
- [13] 罗方雯. 茅台镇酱香型白酒酿造酵母类资源多样性特征研究[D]. 贵州: 贵州大学, 2020.
- LUO F W. Study on the diversity of yeast resources in Maotai Towns Maotai-flavor baijiu[D]. Guizhou: Guizhou University, 2020.
- [14] 胡晓龙, 余苗, 王康丽, 等. 浓香型白酒窖泥微生物群落多样性及理化因素对其影响[J]. 食品研究与开发, 2021, 42(2): 178-185, 204.

- HU X L, YU M, WANG K L, et al. Diversity of microbial community and its correlation with physicochemical factors in Luzhou-flavor liquor pit mud[J]. Food Research and Development, 2021, 42 (2): 178-185, 204.
- [15] 胡申才, 杜艾明, 李良, 等. 清香型白酒酿造菌群结构组成及来源分析[J]. 酿酒科技, 2021(4): 55-60.
- HU S C, DU A M, LI L, et al. Composition and source of the microflora in the fermentation system of qingxiang Baijiu [J]. Liquor -Making Science & Technology, 2021(4): 55-60.
- [16] 贾丽艳, 田宇敏, 王晓勇, 等. 传统清香型白酒发酵过程中真菌群落结构及其动态演替[J]. 中国食品学报, 2020, 20(10): 303-308.
- JIA L Y, TIAN Y M, WANG X Y, et al. Community and change of fungi in fermentation process of the traditional light -aroma Baijiu [J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2020, 20(10): 303-308.
- [17] 王雪山, 杜海, 徐岩. 清香型白酒发酵过程中微生物种群空间分布[J]. 食品与发酵工业, 2018, 44 (9): 1-8.
- WANG X S, DU H, XU Y. Spatial distribution of microbial community during Chinese light -flavor liquorfermentation[J]. Food and Fermentation Industries, 2018, 44(9): 1-8.
- [18] 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会. 食品安全国家标准 食品中水分的测定:GB 5009.3-2016 [S]. 北京: 中国标准出版社, 2016: 1-2.
- National Health and Family Planning Commission of the People's Republic of China. National standard for food safety - determination of moisture in food: GB 5009.3-2016[S]. Beijing: China Standard Press, 2016: 1-2.
- [19] EDGAR R C. UPARSE: Highly accurate OTU sequences from microbial amplicon reads [J]. Nature Methods, 2013, 10(10): 996.
- [20] GRICE E A, KONG H H. Topographical and temporal diversity of the human skin microbiome [J]. Science, 2009, 324(5931): 1190-1192.
- [21] 贾丽艳, 荆旭, 田宇敏, 等. 传统清香型白酒发酵过程中细菌群落结构及其动态演替[J]. 中国食品学报, 2020, 20(2): 196-204.
- JIA L Y, JIN X, TIAN Y M, et al. Community and change of bacteria in fermentation process of the traditional light-flavor Baijiu by Illumina MiSeq high throughput sequencing technology[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2020, 20(2): 196-204.
- [22] 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.
- [23] WANG L, WANG Y Y, WANG D Q, et al. Dynamic changes in the bacterial community in Moutai liquor fermentation process characterized by deep sequencing[J]. Journal of the Institute of Brewing, 2015, 121(4): 603-608.
- [24] WANG X S, DU H, XU Y. Source tracking of prokaryotic communities in fermented grain of Chinese strong-flavor liquor[J]. International Journal of Food Microbiology, 2017, 244: 27-35.
- [25] 陈雪, 张永利, 闫宗科, 等. 凤香型白酒醅微生物群落演替及其与理化指标的相关性分析[J]. 食品科学, 2020, 41(22): 200-205.
- CHEN X, ZHANG Y L, YAN Z K, et al. Correlation analysis of microbial community succession in fermented grains of xifeng-flavor Chinese liquor with its physicochemical indexes[J]. Food Science, 2020, 41(22): 200-205.
- [26] 雷振河. 采用高通量测序技术分析清香型白酒酿造微生物[J]. 食品与发酵工业, 2015, 41 (9): 164-167.
- LEI Z H. Primary analysis on the fermented microorganism of Fen-flavor liquor by high-throughput sequencing [J]. Food and Fermentation Industries, 2015, 41(9): 164-167.

## The Correlation of Microbial Community Structural Changes with Physicochemical Properties during Fermentation of Light Flavor Baijiu

Li Yanting<sup>1</sup>, Guo Shang<sup>1\*</sup>, Guo Xiaofei<sup>1</sup>, Guo Weiwei<sup>1</sup>, Li Guowen<sup>2</sup>, Xu Lina<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>Shanxi Institute of Functional Food, Shanxi Agricultural University, Taiyuan 030031  
<sup>2</sup>JinYu Baijiu Company of Xinghuacun Town, Fenyang 032200, Shanxi)

**Abstract** This paper aimed to analyze the correlation of microbial community structural changes with its physicochemical properties in fermented substrates of the light flavour baijiu. The microbial composition, and correlation between community succession and physicochemical properties in the traditional fermentation process of light flavour baijiu was analyzed. 10 groups of light flavour baijiu fermented substrates were sampled every two days for 28 d (0, 2, 4, 6, 8, 12, 16, 20, 24, 28 d) by traditional batch fermentation. The composition of fungi and bacteria, water content, acidity, pH value, starch content and other physicochemical properties were determined. During the fermentation of light flavour baijiu, bacteria detected were distributed in 18 phyla and fungi in 7 phyla. A total of 467 genera were detected, including 311 bacteria. It mainly included *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*, *Weissella*, *Pantoea*, *Akkermansia*, *Obesumbacterium*, *Streptococcus* with *Lactobacillus* and *Pediococcus* dominated. There were 156 fungal genera, including *Kazachstania*, *Saccharomyces*, *Kurtzmaniella*, *Thermoascus*, *Aspergillus*, *Wickerhamomyces*, etc., where *Kazachstania* and *Saccharomyces* were dominant. The microbial composition in different fermentation containers was slightly different during the same period. The correlation analysis between microbial diversity and physicochemical properties in fermented substrates showed that the bacterial diversity was strongly and positively correlated with fermentation temperature and pH value, but negatively correlated with water and alcohol content. At the same time, fungal diversity in fermented substrates was not significantly correlated with physicochemical properties.

**Keywords** the light flavour baijiu; high-throughput sequencing technology; physical and chemical indicators; microbial diversity; correlation analysis