

沪型酒中温大曲微生物群落的演替及 其对酒醅发酵的贡献



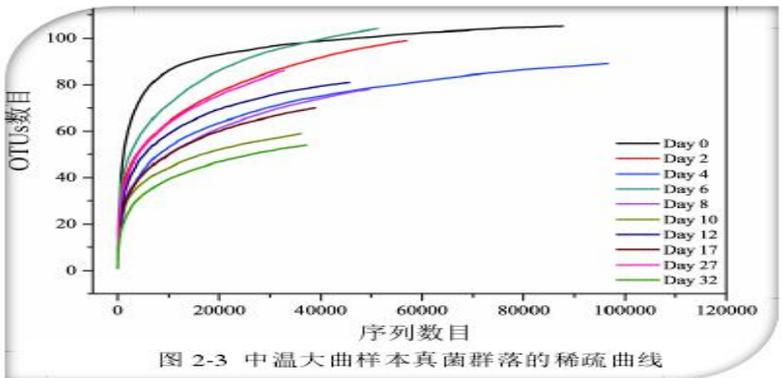
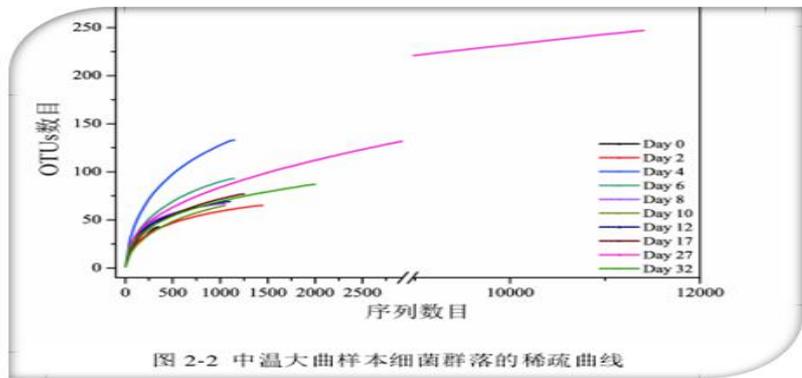
二、中温大曲发酵过程中微生物群落结构及其演替规律

Tab. 2-1 Sequencing data and alpha diversity of bacterial community in Daqu samples

样本名称 SampleID	原始序列 Raw reads	质控序列 Trim reads	多样性指数 Diversity index				
			OTUs	Ace	Chao1	Shannon	Coverage
Day 0	1564	1144	64	138	127	2.21	96.7%
Day 2	2161	1729	80	101	92	2.80	98.7%
Day 4	1544	1129	134	218	183	3.97	95.8%
Day 6	1595	1151	96	126	118	3.25	97.4%
Day 8	1582	1081	78	90	87	3.49	98.5%
Day 10	1882	1073	73	103	105	2.55	97.4%
Day 12	1451	1071	74	91	91	3.22	98.1%
Day 17	1860	1314	81	104	98	3.03	98.2%
Day 27	15592	11749	263	836	481	3.54	98.9%
Day 32	2856	2057	93	131	138	3.21	98.4%

Tab. 2-2 Sequencing data and alpha diversity of fungal community in Daqu samples

样本名称 SampleID	原始序列 Raw reads	质控序列 Trim reads	多样性指数 Diversity index				
			OTUs	Ace	Chao1	Shannon	Coverage
Day 0	88206	87707	105	110	107	1.98	100.0%
Day 2	57036	56864	99	123	111	2.14	100.0%
Day 4	96710	96495	89	99	98	1.67	100.0%
Day 6	51620	51287	104	117	115	2.6	100.0%
Day 8	49797	49578	78	96	91	1.96	100.0%
Day 10	36426	36187	59	72	67	1.1	100.0%
Day 12	46299	45618	81	90	87	1.44	100.0%
Day 17	39277	38819	70	86	85	1.46	100.0%
Day 27	33016	32778	86	112	118	2.19	99.9%
Day 32	37538	37097	54	66	63	1.18	100.0%



微生物群落 **α-多样性分析**：从表 2-1 和 2-2，以及图 2-2 和 2-3 中可知，大曲发酵过程中微生物群落的丰富度与多样性一直与外界环境进行**动态交互**，并在大曲发酵的后期形成一个比较稳定的群落结构，这是中温大曲品质保持相对稳定的重要原因。



中温大曲样本中细菌群落分类学分析

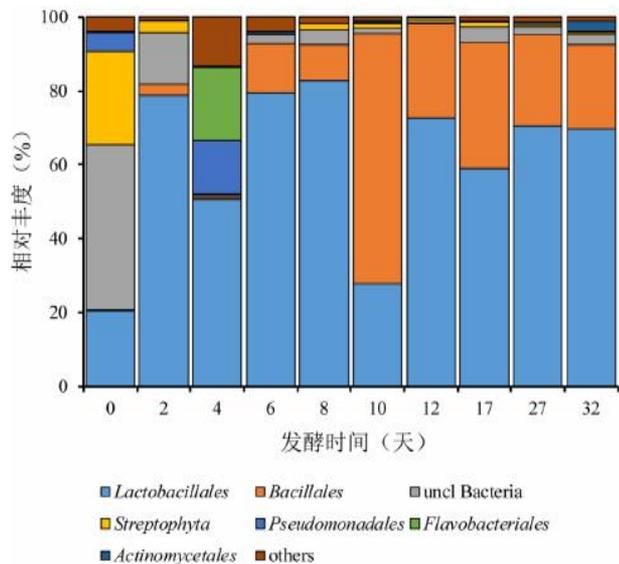


图 2-4 大曲发酵过程中细菌群落在目水平的组成 (未注释的微生物用 'uncl' 表示, 'others' 表示相对丰度小于 0.5% 细菌属的集合)

从图2-4 中可以发现, 细菌群落主要由 **6 个目** 构成: 乳杆菌目 (*Lactobacillales*)、*Bacillales*、Streptophyta、假单胞菌目 (*Pseudomonadales*)、黄杆菌目 (*Flavobacteriales*) 和放线菌目 (*Actinomycetales*), 其相对丰度之和平均为 89.5%。

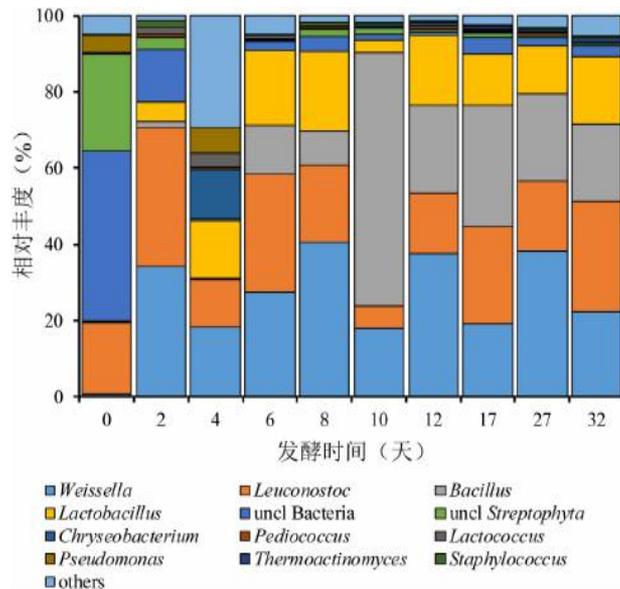


图 2-5 大曲发酵过程中细菌群落在属水平的组成 (未注释的微生物用 'uncl' 表示, 'others' 表示相对丰度小于 0.5% 细菌属的集合)

从图2-5 中可以发现, 细菌群落主要由 **10 个属** 构成: 魏氏菌属 (*Weissella*)、明串珠菌属 (*Leuconostoc*)、芽孢杆菌属 (*Bacillus*)、乳杆菌属 (*Lactobacillus*)、金黄杆菌属 (*Chryseobacterium*)、片球菌属 (*Pediococcus*)、乳球菌属 (*Lactococcus*)、假单胞菌属 (*Pseudomonas*)、高温放线菌属 (*Thermoactinomyces*) 和葡萄球菌属 (*Staphylococcus*), 其相对丰度之和平均为 83.3%。魏氏菌属 (*Weissella*)、明串珠菌属 (*Leuconostoc*) 和乳杆菌属 (*Lactobacillus*) 作为主要的乳酸菌在整个发酵过程中处于优势地位, 而芽孢杆菌属在发酵10天后成为主要的优势菌群。

从图2-4 与图2-5 中发现, **乳杆菌目** (*Lactobacillales*) 与 *Bacillales* 是大曲发酵过程中的优势微生物。



中温大曲中 *Lactobacillales* 与 *Bacillales* 在属水平的结构组成

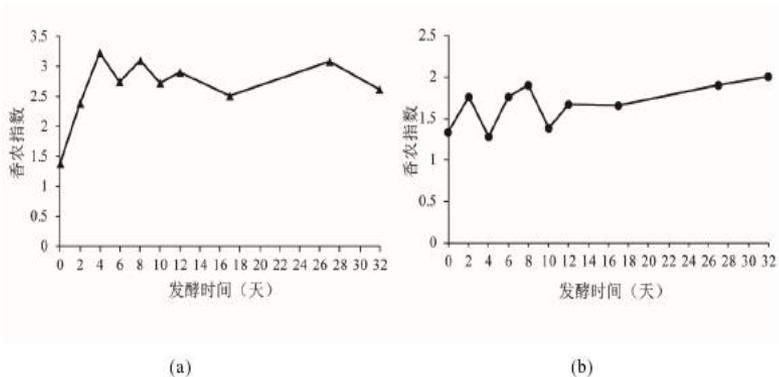


图 2-6 大曲发酵过程中乳杆菌目和 *Bacillales* 香农指数的变化 (a) 乳杆菌目 (b) *Bacillales*
 Fig. 2-6 Shannon index of *Lactobacillales* and *Bacillales* during Daqu fermentation process (a) *Lactobacillales* (b) *Bacillales*

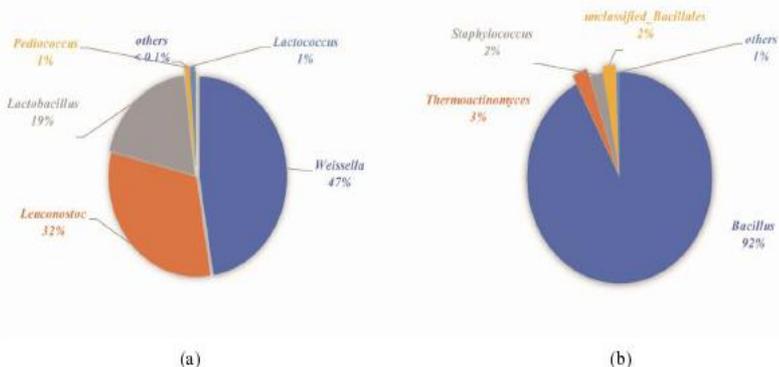


图 2-7 大曲中乳杆菌目和 *Bacillales* 在属水平上的组成 (a) 乳杆菌目 (b) *Bacillales*
 Fig. 2-7 Composition of *Lactobacillales* and *Bacillales* in Daqu at genus level (a) *Lactobacillales* (b) *Bacillales*

分别 *Lactobacillales* 与 *Bacillales* 的 OTUs 进行分析, 香农指数 (Shannon Index) 的变化如图 2-6 所示。

从图 2-7a 中可以发现, 乳杆菌目 (*Lactobacillales*) 共有 12 个属信息: 乳杆菌科 (*Lactobacillales*) 共有 12 个属信息, 其中大部分 OTUs 归属到魏氏菌属 (*Weissella*)、明串珠菌属 (*Leuconostoc*)、乳杆菌属 (*Lactobacillus*)、片球菌属 (*Pediococcus*) 以及乳球菌属 (*Lactococcus*), 其余 7 个属的 OTUs 所占比例小于 0.2%。

从图 2-7b 中可以看到, *Bacillales* 共有 13 个属信息: 其中大部分 OTUs 归属于芽孢杆菌属 (*Bacillus*)、高温放线菌属 (*Thermoactinomyces*)、葡萄球菌属 (*Staphylococcus*) 以及未分类的 *Bacillales*, 其余 9 个属的 OTUs 所占比例小于 1%。



中温大曲样本中真菌群落分类学分析

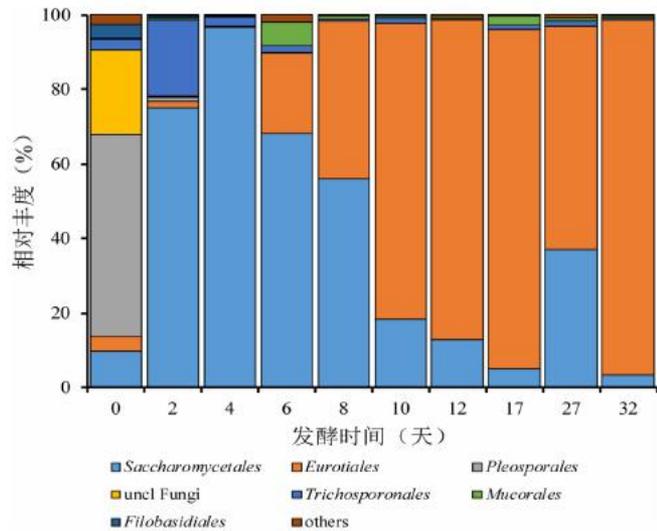


图 2-8 大曲发酵过程中真菌群落在目水平的组成 (未注释的微生物用‘uncl’表示, ‘others’表示相对丰度小于 0.8% 真菌属的集合)

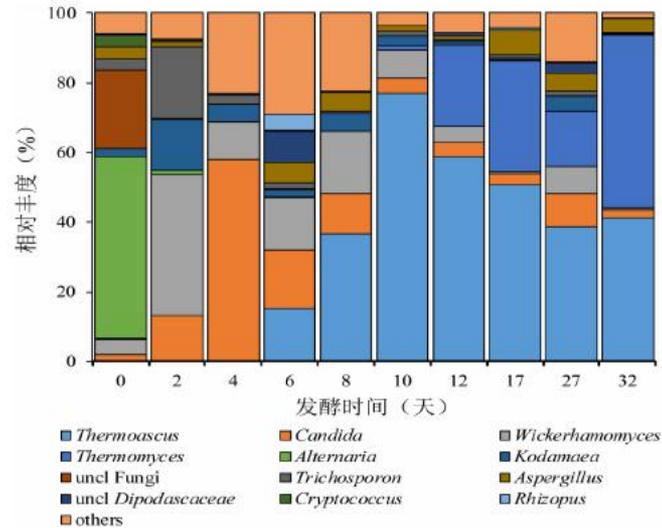


图 2-9 大曲发酵过程中真菌群落在属水平的组成 (未注释的微生物用‘uncl’表示, ‘others’表示相对丰度小于 0.8% 真菌属的集合)

从图 2-8 中可以发现, 真菌群落主要由 6 个目构成 (相对丰度 > 0.5%) : 酵母菌目 (*Saccharomycetales*)、散囊菌目 (*Eurotiales*)、格孢菌目 (*Pleosporales*)、Trichosporonales、毛霉菌目 (*Mucorales*) 和线黑粉目 (*Filobasidiales*) , 其相对丰度之和平均 97.0%。酵母菌目 (*Saccharomycetales*) 和散囊菌目 (*Eurotiales*) 在整个发酵过程中处于优势地位。

从图 2-9 中可以发现, 真菌群落主要由 10 个属构成 (相对丰度 > 0.5%) : 嗜热子囊菌属 (*Thermoascus*)、假丝酵母属 (*Candida*)、*Thermomyces*、*Wickerhamomyces*、链格孢属 (*Alternaria*)、*Trichosporon*、曲霉菌属 (*Aspergillus*)、*Kodamaea*、根霉菌属 (*Rhizopus*) 和隐球菌属 (*Cryptococcus*) , 其相对丰度之和平均为 84.7%。

从图 2-8 与图 2-9 中发现, 酵母菌目 (*Saccharomycetales*) 与散囊菌目 (*Eurotiales*) 是大曲发酵过程中的优势微生物。大曲真菌群落由以格孢菌目 (*Pleosporales*) 以及未知真菌为主导向以酵母菌目 (*Saccharomycetales*) 以及散囊菌目 (*Eurotiales*) 为主导转变。



中温大曲中Saccharomycetales和Eurotiales在属水平的结构组成

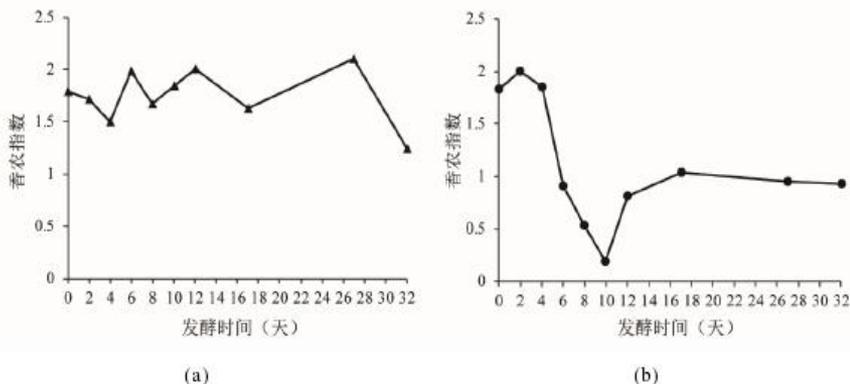


图 2-10 大曲发酵过程中酵母菌和散囊菌香农指数的变化 (a) 酵母菌 (b) 散囊菌

Fig. 2-10 Shannon index of *Saccharomycetales* and *Eurotiales* during Daqu fermentation process (a) *Saccharomycetales* (b) *Eurotiales*

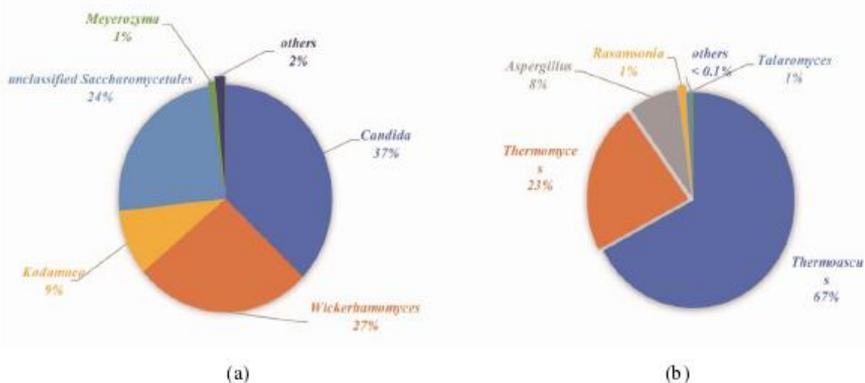


图 2-11 大曲中酵母菌和散囊菌在属水平上的组成 (a) 酵母菌 (b) 散囊菌

Fig. 2-11 Composition of *Saccharomycetales* and *Eurotiales* in Daqu at genus level (a) *Saccharomycetales* (b) *Eurotiales*

酵母菌目 (*Saccharomycetales*) 与散囊菌目 (*Eurotiales*) 香农指数 (Shannon Index) 的变化如图 2-10 所示。

通过与 Unite 数据库比对分析, 从图 2-11 a 中可以发现, 酵母菌目 (*Saccharomycetales*) 共有 10 个属信息。

从图 2-11 b 中可以发现, 散囊菌目 (*Eurotiales*) 共有 9 个属信息: 其中大部分 OTUs 归属于嗜热子囊菌属 (*Thermoascus*)、*Thermomyces*、曲霉菌属 (*Aspergillus*)、*Rasamsonia* 以及 *Talaromyces*, 其余 4 个属的 OTUs 所占比例小于 0.5%。



中温大曲发酵不同阶段中微生物群落的比较分析 (Bray-Curtis 相异性指数)

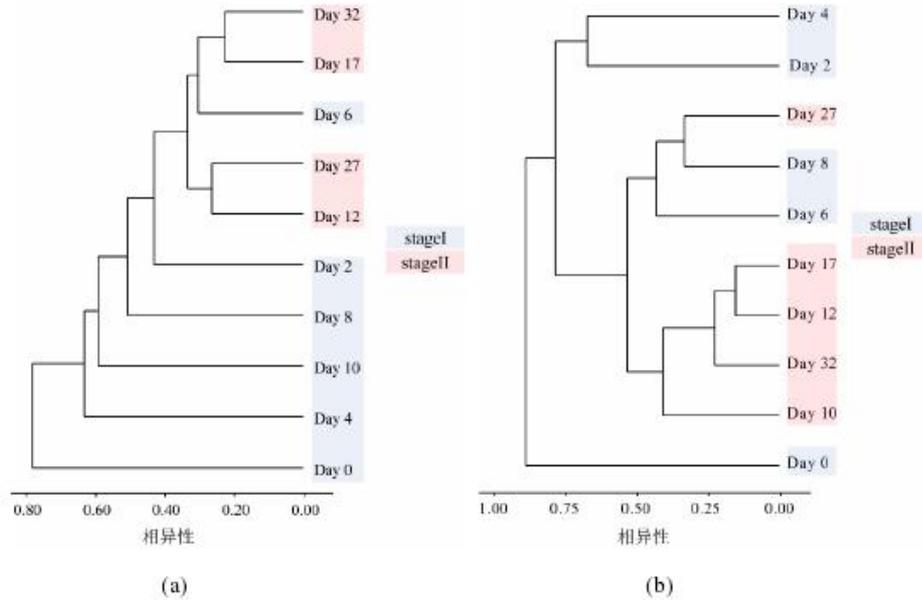


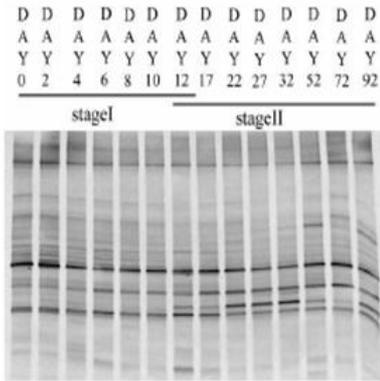
图 2-12 基于 Bray-Curtis 相异性指数的大曲样本聚类分析 (a) 细菌群落 (b) 真菌群落

从图 2-12a 中我们可以发现，大曲发酵过程前中期 (0-12 d) 细菌群落结构与中后期 (12-32 d) 大曲中的**细菌群落**有较大差异，并且发酵前中期 (0-12 d) 样本中细菌群落变化较大，发酵中后期 (12-32 d) 样本中细菌群落变化较小。

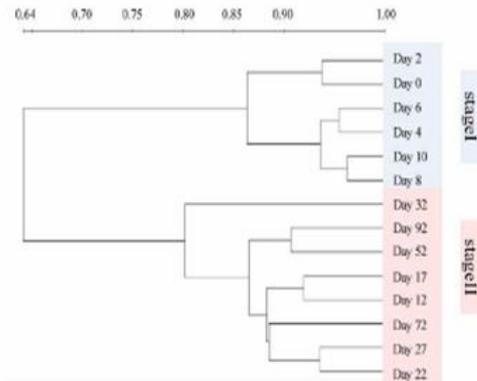
从图2-12b中可以发现，根据聚类分析可发现大曲发酵过程前中期 (0-12 d) 发酵前中期 (0-12 d) 样本中**真菌群落**变化显著，发酵中后期 (12-32 d) 样本中真菌群落无明显变化。



中温大曲发酵过程中微生物群落结构的变化分析



(a)

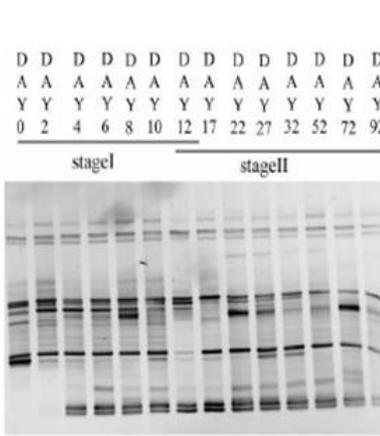


(b)

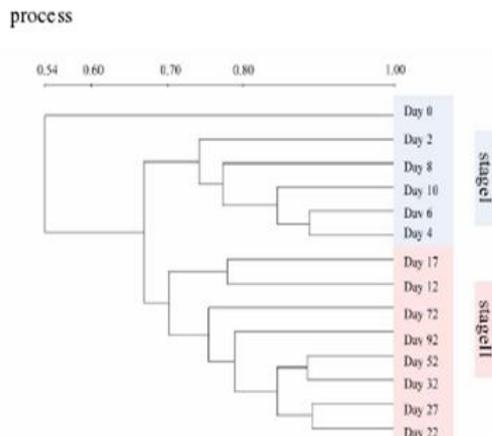
图 2-13 大曲发酵过程大曲样本细菌 16S rDNA DGGE 图谱及聚类图

Fig. 2-13 DGGE profile of bacterial 16S rDNA and Cluster analysis of Daqu samples in fermentation

采用 PCR-DGGE 的方法对另一批次中温大曲的微生物群落结构进行分析，并将分析的结果进行聚类分析，结果如图 2-13 和图 2-14 所示。



(a)



(b)

图 2-14 大曲发酵过程大曲样本真菌 18S rDNA DGGE 图谱及聚类图

大曲中细菌与真菌的群落结构随着发酵进行而不断的变化，且大曲的样本明显归为两大类，分别位于两个不同的分支。大曲发酵过程（0-92 d）同样分为两个阶段：第一阶段（0-12 d），第二阶段（12-92d）。



第二章小结

- 1.通过对大曲发酵过程中微生物多样性指数进行分析，我们发现微生物（细菌和真菌）的丰富度与多样性随大曲发酵时间的变化而改变，与大曲发酵过程中其他样本相比，新鲜曲坯中细菌种类较少，而真菌种类较多。
2. 发酵开始时，细菌和真菌群落的丰富度与多样性逐步增加，当大曲品温较高时，微生物群落的丰富度与多样性明显减少，在大曲发酵 10 天后，微生物群落的丰富度与多样性基本保持稳定。
- 3.大曲中的细菌群落归属于 45 个目，乳杆菌目 (*Lactobacillales*) 与 *Bacillales* 是大曲发酵过程中的优势细菌。
- 4.大曲中的真菌群落归属于34个目，酵母目 (*Saccharomycetales*) 与散囊菌目 (*Eurotiales*) 是大曲发酵过程中的优势真菌。
- 5.通过聚类分析，大曲发酵前期与后期的微生物群落结构有明显差异，并可将大曲发酵过程划分为 2 个阶段：阶段 I (0–12 d)，阶段 II (12–32 d)。阶段 I 中微生物群落演替频繁，而阶段 II 中微生物群落基本保持稳定。



三、中温大曲微生物群落演替驱动力分析

--环境因素、生物量以及酶活的变化规律

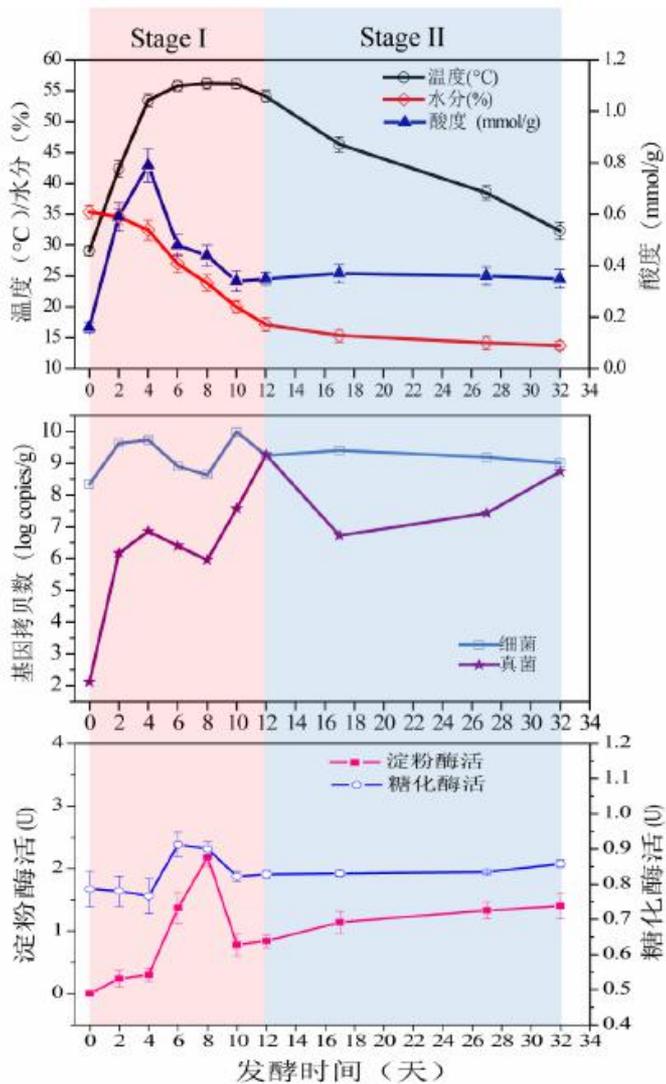


图 3-1 中温大曲发酵过程中环境因素，生物量和酶活的动态变化

表 3-1 大曲发酵过程中微生物群落演替与环境因素的相关性

Tab. 3-1 Correlations between environmental variable dynamics and microbial community succession

during the fermentation process of MT-Daqu

环境因素 Environmental variables	细菌/Bacteria ^a (Stage I)		真菌/Fungi (Stage I)		细菌/Bacteria (Stage II)		真菌/Fungi (Stage II)	
	<i>r</i>	<i>P</i>	<i>r</i>	<i>P</i>	<i>r</i>	<i>P</i>	<i>r</i>	<i>P</i>
温度 Temperature	0.71	0.02	0.76	0.01	-0.50	0.83	-1.00	1.00
水分 Moisture	0.18	0.16	0.67	0.00	-0.50	0.83	-1.00	1.00
酸度 Titratable acidity	0.50	0.11	0.54	0.03	-0.87	1.00	-0.87	1.00

^a*r*, Spearman相关系数, *P* < 0.05 表示显著相关, 阶段I: 0-12 d; 阶段II: 12-32 d.

通过分析中温大曲发酵过程不同阶段微生物群落演替与**环境因素**变化的相关性 (表3-1), 并结合环境因素动态变化 (图 3-1), 我们发现大曲发酵过程**阶段 I**是大曲微生物群落形成的重要时期。



中温大曲微生物群落演替与温度变化的相关性

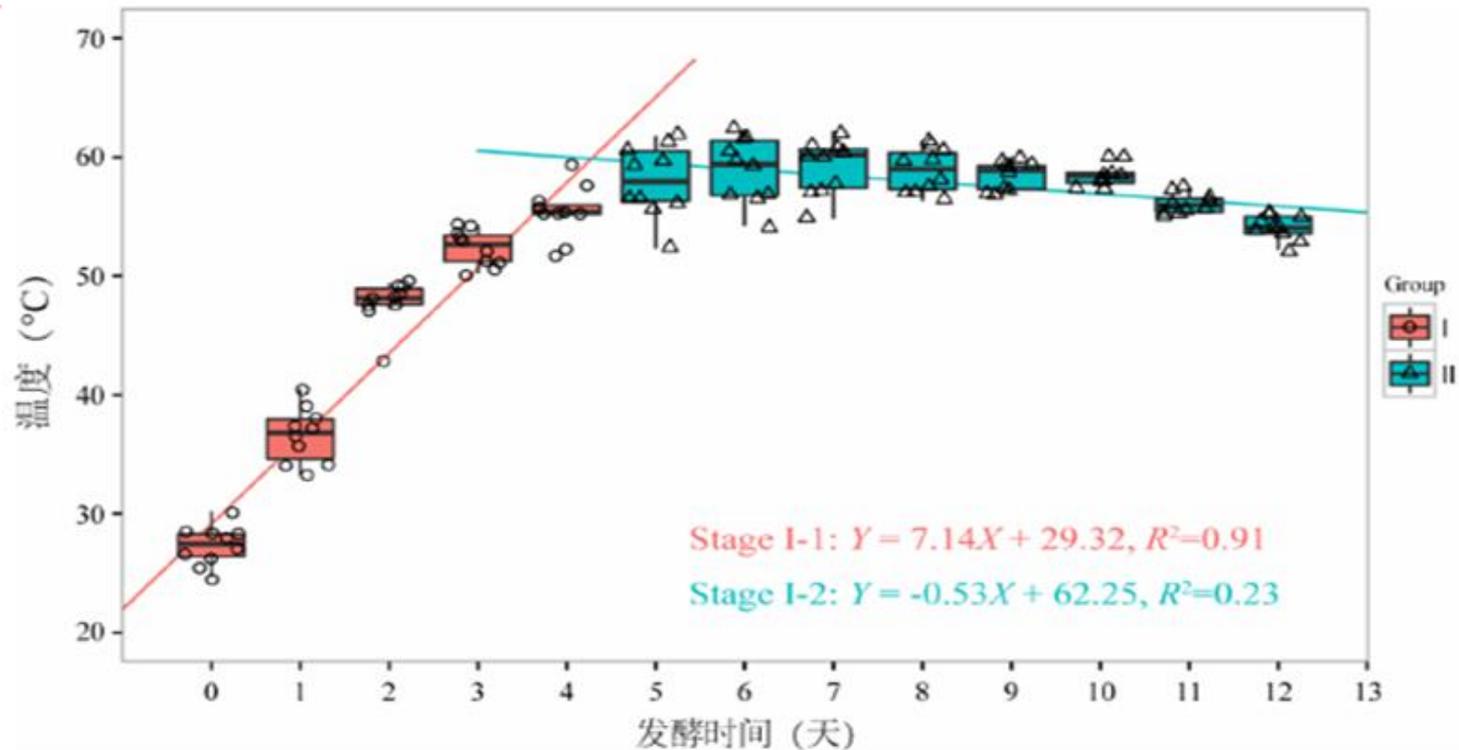


图 3-2 10 批次中温大曲发酵过程中温度的变化

我们依据温度的变化，将中温大曲发酵阶段 I 划分为两个子阶段：阶段 I-1 (0-4 d)，阶段 I-2 (4-12 d)。



中温大曲微生物群落演替与温度变化的相关性

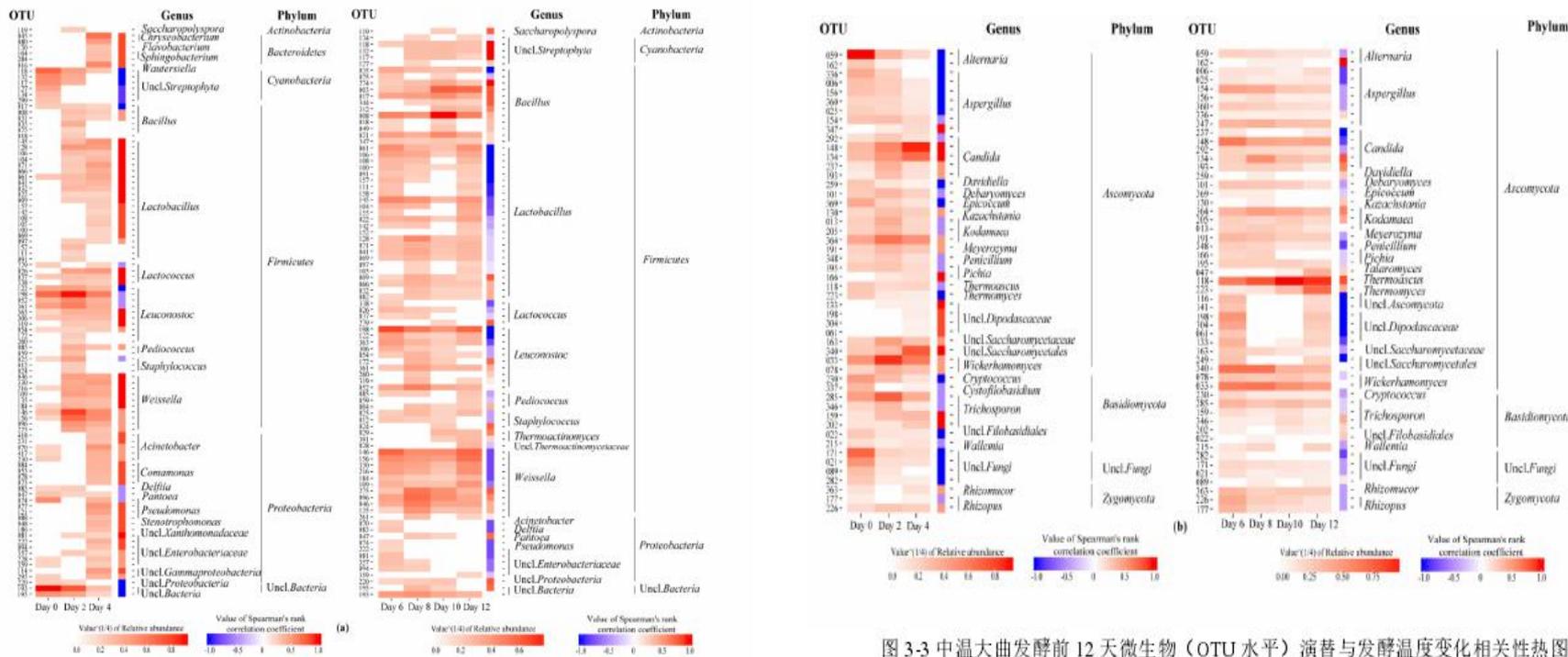


图 3-3 中温大曲发酵前 12 天微生物 (OTU 水平) 演替与发酵温度变化相关性热图

大部分来自于环境中的微生物在**适宜**的温度和充足营养的条件下快速的生长和繁殖；它们的**呼吸和代谢**作用则是大曲温度快速增长的主要原因；某些来自谷物原料和水的微生物由于**不适应**大曲发酵环境而逐渐消亡。



温度对中温大曲功能微生物群落形成的影响及大曲微生物群落的差异分析

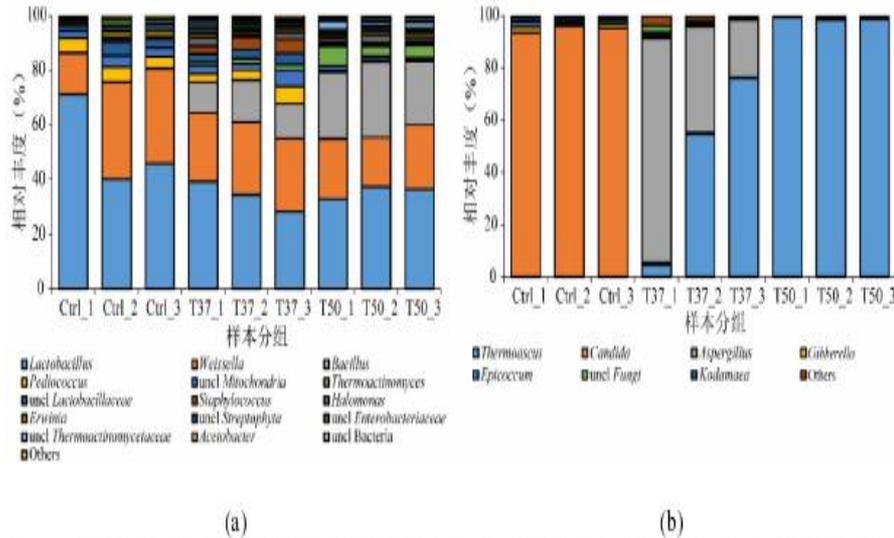


图3-4 环境温度对大曲微生物群落结构的影响 (a) 细菌群落 (b) 真菌群落 (未注释的微生物用 ‘uncl’表示, ‘Others’表示相对丰度小于0.5%细菌属与小于0.2%真菌属的集合)

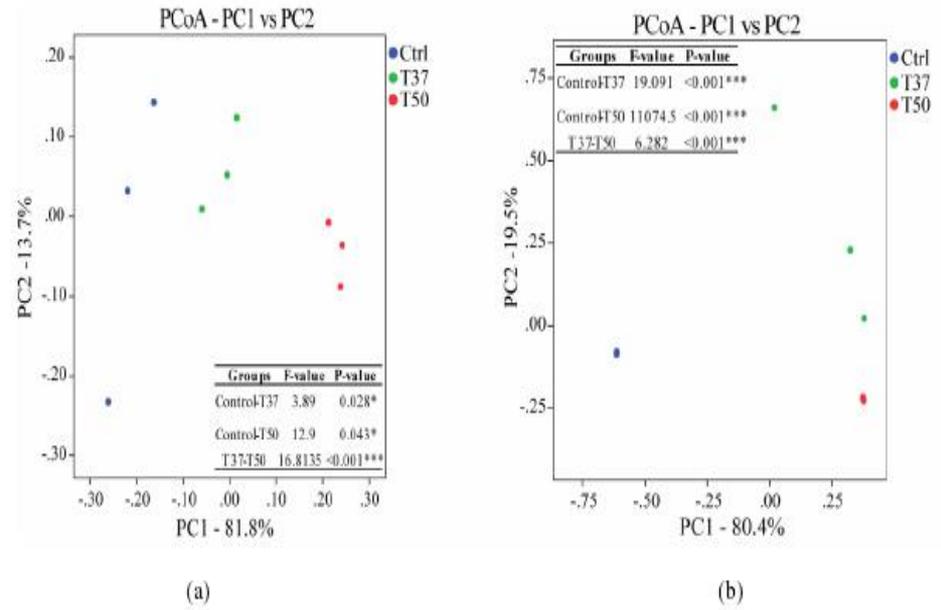


图3-5 不同组别微生物群落结构的比较 (a) 细菌群落 (b) 真菌群落

不同组别之间的群落组成如图3-4a、3-4b所示；通过主坐标分析（PCoA）以及分子方差（AMOVA）分析（图3-5）可知，三组大曲样本的微生物群落结构两两之间均具有**显著性差异**（ $P < 0.05$ ）。



大曲微生物群落的差异分析

表 3-2 不同组别差异显著性细菌 OTUs 分析

Tab. 3-2 Bacterial OTUs differentially distributed in the MT-Daqu microbiotas formed at different temperature

OTU 编号 OTU ID	T37		T50		P- value	物种 Species
	Mean (%)	Variance	Mean (%)	Variance		
OTU010	13.09	0.04	22.73	0.02	0.01	<i>Bacillus licheniformis</i>
OTU017	1.75	0.00	5.24	0.04	0.04	<i>Thermoactinomyces vulgaris</i>
OTU022	0.24	0.00	9.16	0.01	0.00	<i>Lactobacillus fermentum</i>
OTU027	0.03	0.00	0.08	0.00	0.01	<i>Lactobacillus buchneri</i>
OTU041	0.01	0.00	0.11	0.00	0.04	<i>Staphylococcus sciuri subsp</i>
OTU042	0.05	0.00	0.18	0.00	0.02	<i>Lactobacillus paracasei</i>
OTU071	5.83	0.02	9.54	0.00	0.03	<i>Lactobacillus farciminis</i>
OTU004	4.34	0.01	0.43	0.00	0.02	<i>Staphylococcus gallinarum</i>
OTU016	2.26	0.00	0.68	0.00	0.03	<i>Lactobacillus brevis</i>
OTU044	4.36	0.03	0.78	0.00	0.04	<i>Pediococcus pentosaceus</i>
OTU058	26.48	0.01	21.31	0.08	0.04	<i>Weissella confusa</i>
OTU116	3.44	0.00	0.79	0.00	0.01	<i>Lactobacillus plantarum</i>
OTU122	0.11	0.00	0.00	0.00	0.00	<i>Saccharopolyspora rectivirgula</i>

表 3-3 不同组别差异显著性真菌 OTUs 分析

Tab. 3-3 Fungal OTUs differentially distributed in the MT-Daqu microbiotas formed at different temperature

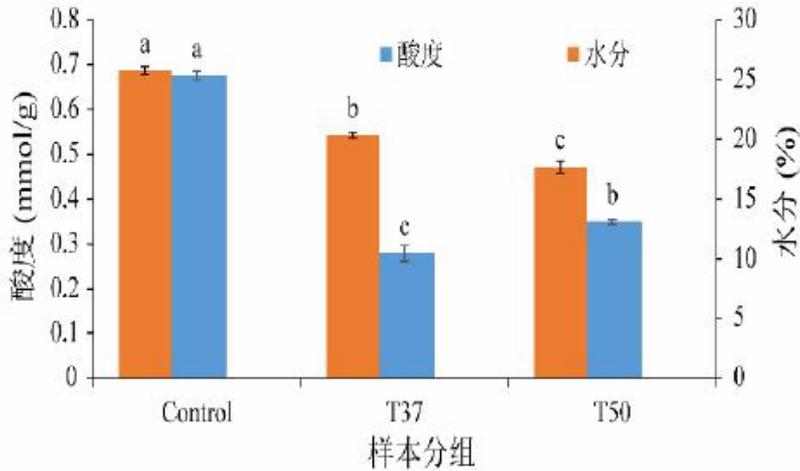
OTU 编号 OTU ID	T37		T50		P- value	物种 Species
	Mean (%)	Variance	Mean (%)	Variance		
OTU010	0.30	0.00	0.68	0.00	0.01	<i>Thermoascus sp</i>
OTU043	45.08	13.44	98.01	0.00	0.03	<i>Thermoascus sp</i>
OTU004	0.91	0.00	0.00	0.00	0.02	<i>Aspergillus penicillioides</i>
OTU016	0.64	0.00	0.04	0.00	0.02	<i>Epicoccum nigrum</i>
OTU028	0.01	0.00	0.00	0.00	0.04	<i>Cladosporium ramotenellum</i>
OTU045	0.60	0.00	0.06	0.00	0.03	<i>Gibberella zeae</i>
OTU051	46.28	9.29	0.01	0.00	0.01	<i>Aspergillus amstelodami</i>

表 3-2和表3-3 分别展示了T37 group 与 T50 group两组之间具有显著性差异的微生物。

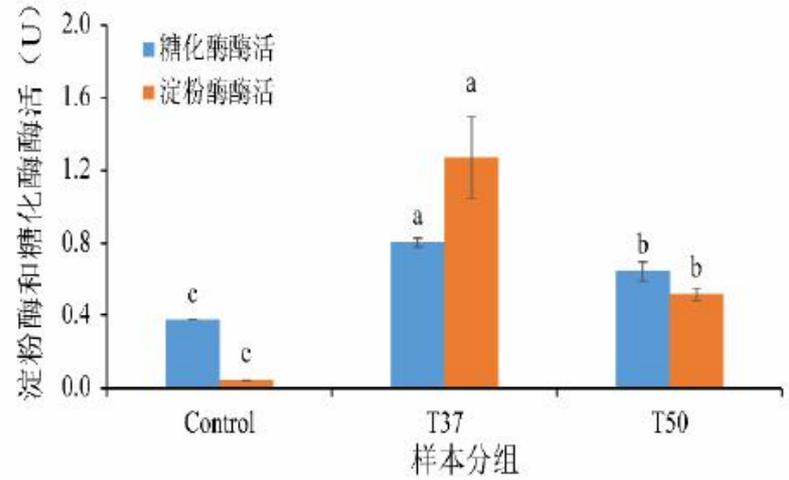
较高的发酵温度会使菌群逐渐适应耐热和低水活度的微生物群落进行转变。



大曲理化性质及酶活的分析



(a)



(b)

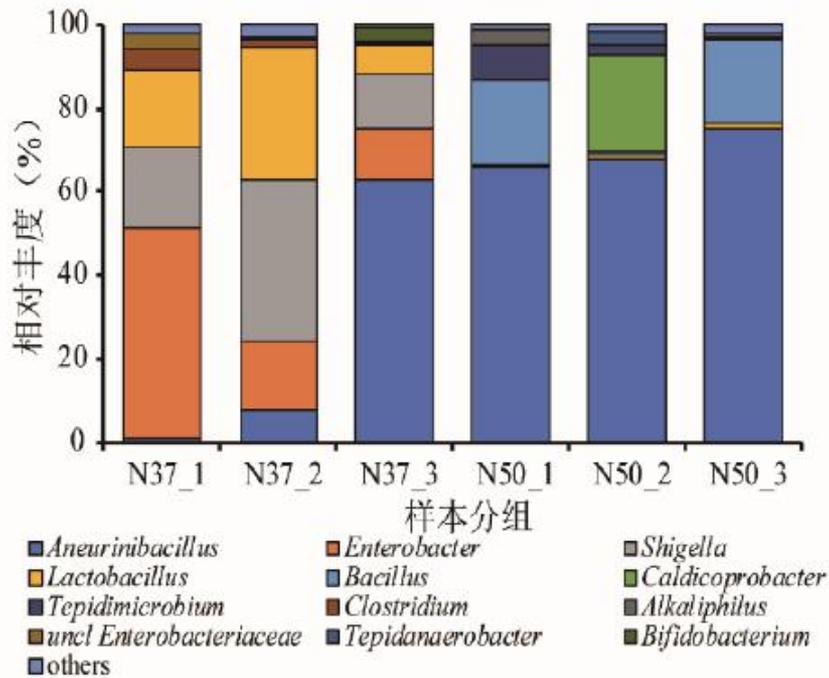
水分: T37 > T50 group

酸度: T37 < T50 group (乳酸菌)

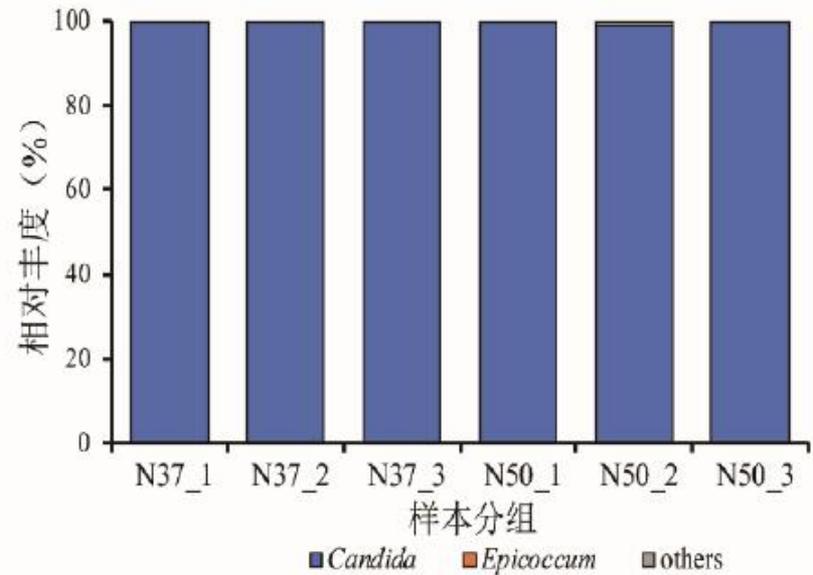
酶活力: T37 > T50 group (曲霉菌)



温度对异位培养大曲微生物群落结构的影响



(a)



(b)

不同发酵温度条件下，(NB) 培养基中细菌群落结构差异较大。真菌培养基中 (PDA 培养基) 大曲样本的真菌群落结构基本相同。



第三章小结

1. 大曲发酵阶段 I (0–12 d) 中，细菌群落演替与温度呈显著线性相关。但是，细菌群落的演替与另两个环境因素（水分与酸度）没有显著相关性 ($P > 0.05$)；而真菌群落演替与所测环境因素（温度、水分和酸度）呈显著相关 ($P < 0.05$)。在大曲发酵阶段 II (12–32 d)，微生物群落演替与所测环境因素（温度、水分和酸度）没有显著相关性。
2. 依据温度变化趋势，我们将中温大曲发酵阶段 I (0–12 d) 再次进行划分，划分为两个子阶段：阶段 I-1 (0–4 d)，阶段 I-2 (4–12 d)。
3. 过对不同温度条件下大曲发酵的微生物群落结构、理化因子及酶活的测定分析。T37 group 与 T50 group 的微生物群落结构有显著的差异。
4. 不同温度培养下，大曲样本 (NB 培养基中培养) 的细菌群落结构差异较大。与之前原位条件下大曲微生物群落结构比较，两者之间微生物群落结构有明显的差异，说明培养基的组成以及培养方式同样对大曲微生物群落有较大的影响。