

国香型白酒多轮次堆积发酵细菌群落研究

摘要:基于MiSeq平台采用高通量测序技术对国井绵雅酱香不同轮次堆积发酵酒醅中的细菌进行解析,共检出32个细菌门,706个细菌属。优势细菌门为Firmicutes、Proteobacteria和Actinobacteria,优势细菌属为Lactobacillus、Acetobacter、Kroppenstedtia和Bacillus。同时弄清了不同轮次绵雅酱香堆积发酵酒醅中的细菌群落结构多样性及特征,为国井绵雅酱香型白酒高品质酿造提供了科学依据。

关键词:国井绵雅酱香型白酒;堆积发酵;细菌群落

山东扳倒井股份有限公司 山东好客酒业有限公司 许玲 董乔娟 姜明慧 孙泽青 王洋 白秀彬 赵纪文

酱香型白酒是中国最具有代表性的蒸馏酒,以其独特的酿造工艺形成酱香突出、酒体醇厚、空杯留香等风格体系^[1],发酵酒醅中的微生物结构决定着酒的质量与酒体风味。细菌在发酵过程中,主要是分泌风味型酶、代谢产生风味物质、调节发酵过程的微生态结构等。

因此,研究酱香型白酒发酵过程的细菌群落多样性及其结构,对解析酱香型白酒独特风味的形成具有重要的意义^[2]。

酱香型白酒酿造工艺复杂,其中,高温堆积是酱香型白酒独特而又关键的工艺环节之一。堆积的过程是一个物系、酶系、菌系平衡的过程,有的行业专家称其为“二次制曲”。本文以国井不同轮次酱香堆积发酵后的酒醅为样本,分析了细菌的菌群结构特征,也是厌氧发酵的菌系底盘。

1. 材料与方法

样品采自山东扳倒井股份有限公司7个不同轮次酱香堆积发酵后的酒醅,每堆酒醅按照升温情况,在中轴断面分为五个层次,每个层次分别取样,并在每个温度层的所有位置均匀取样,最后将五个层次的样品进行混合,四分法取样,即可代表本轮次堆积酒醅。每轮次样品采集完后,及时将样品转移至-80℃冰箱密封保存。

2. 结果与分析

2.1 不同轮次的细菌群落 Alpha 多样性

2.1.1 基于可操作分类单元 (OTU) 聚类分析

利用扩增子测序技术分析国井酱香型白酒7个不同轮次堆积发酵酒醅中的细菌群落结构多样性及演替规律,共获得1784438条高质量序列。对不同轮次堆积发酵酒醅样品利用Rarefaction curve进行评估,结果表明,本研究每个样本的序列数均超过了30000,且样本的稀释曲线与Shannon指数曲线均趋于平坦,充分说明测序数据量足够大,完全可以反映样本中绝大多数微生物的多样性信息。

2.1.2 多样性分析

Alpha多样性分析可揭示堆积发酵酒醅中微生物群落的丰富度和多样性:Shannon指数反应微生物群落的物种多样性,Coverage指数反应微生物群落覆盖度。

由表1可知,不同轮次堆积酒醅样本共得到OTU数为1410,其中,第2轮次样本中的OTU数最高(251个),下沙轮次最低(137个)。Chao和Ace值越高,说明群落越丰富;Shannon和Simpson值表示群落多样性,Shan-

non值越高,说明群落多样性越明显;而Simpson值越高,说明群落多样性越低。第2轮次样本中的Chao和Ace值最高,下沙轮次最低;第5轮次的Shannon值最高,第2轮次的Shannon值最低。各个样本的覆盖率都在99.90%以上,说明各样品文库的覆盖率足够大,测序结果可体现堆积酒醅样本细菌群落多样性的真实情况。

2.2 不同轮次的细菌物种与群落结构分析

采用堆积柱形图直观呈现样本中各细菌的相对丰度。对不同轮次酱香堆积发酵酒醅中细菌的16S rDNA基因V3~V4区序列进行分析,研究其细菌物种和群落结构,右图为不同轮次堆积发酵酒醅样本在门水平上的细菌群落结构组成。

门水平上,酱香型白酒7个轮次堆积酒醅中依次检测出10、10、19、12、15、14个和19个细菌门,共32个门。

7个轮次共有的细菌门为Firmicutes、Proteobacteria、Actinobacteria、Bacteroidetes、Cyanobacteria和Chloroflexi,在各轮次中,这些门的总占比在98%以上。各轮次优势细菌门为Firmicutes(13.4%~96.8%)、Proteobacteria(2.7%~75.8%)、Actinobacteria(0.2%~24.0%),在各轮次中,这些门的总占比在97%以上。其中,Firmicutes在下沙、造沙、一轮、四轮中相对丰度均高于50%,是7个轮次堆积酒醅样品中平均相对丰度(54.8%)最高的优势细菌门。Proteobacteria平均相对丰度(37.9%)次之,其在二轮、三轮、五轮中的相对丰度均高于50%。Actinobacteria平均相对丰度为7.36%,在三轮中的相对丰度为23.96%。

王欢等从酱香白酒机械化酿造1~7轮次堆积发酵酒醅中检出14个细菌门类,结果显示,Proteobacteria、Actinobacteria和Firmicutes为酒醅样本中的优势菌门;任爱容等从茅台镇主产区大曲样本中检测出21个门,其中4个为优势菌门,分别是Firmicutes、Proteobacteria、Actinobacteria和Bacteroidetes;郭敏等对酱香大曲制曲微生物多样性进行了研究,从曲胚中共检出细菌9个门,其优势菌门主要为Firmicutes、Proteobacteria、Actinobacteria^[3]。此外,Firmicutes和Proteobacteria也被发现是酱香及芝麻香型白酒酿造过程中的主要细菌门,说明这2个菌门种群是中国白酒发酵过程中的关键微生物^[4]。

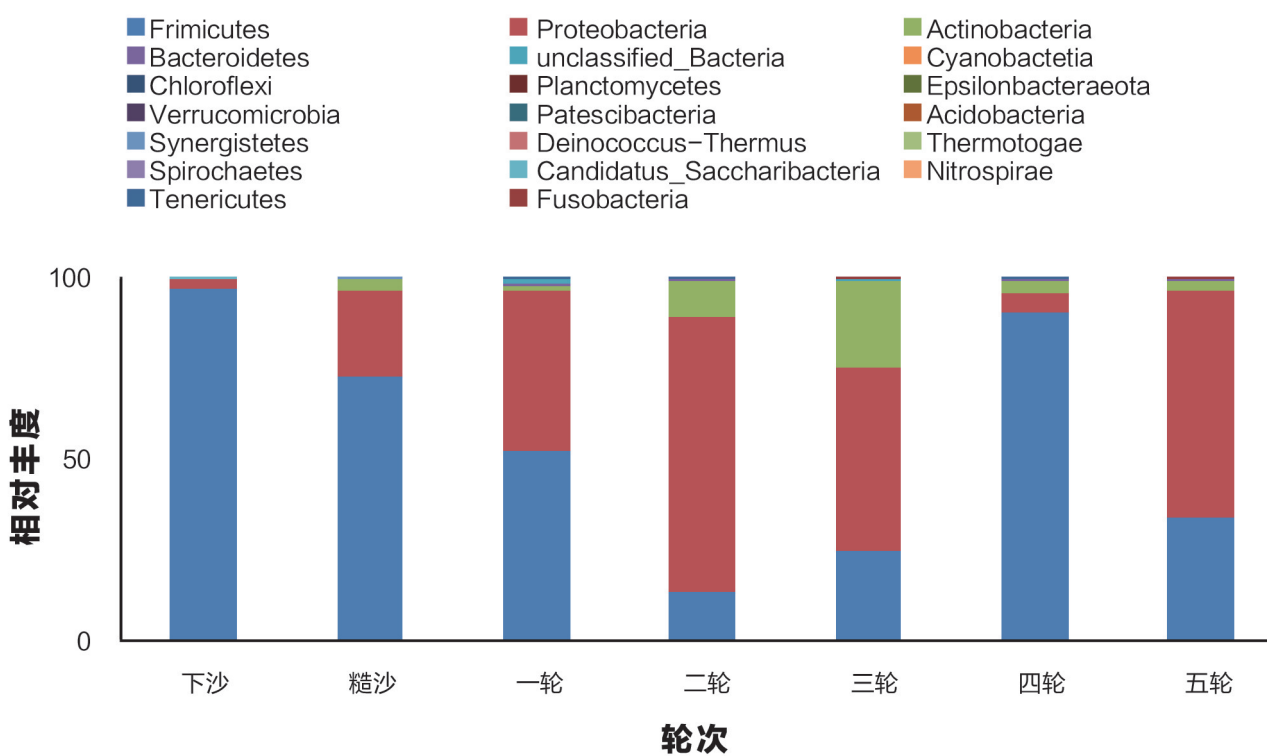
在细菌属水平上,酱香型白酒7个轮次堆积酒醅中依次检出80、204、153、204、170、196和258个细菌属,共检测出706个不同的细菌属。相对丰度≥1%的细菌属在7个轮次中的分布数量依次为5、7、8、8、15、10、13,这些属为各轮次堆积发酵酒醅中的优势细菌属,也表现了各酿造轮次堆积发酵酒

表1 不同轮次细菌群落多样性指数

轮次	OTUs	Shannon	Chao	Ace	Simpson	Shannoneven	Coverage
下沙	137	1.79	151.30	152.84	0.28	0.36	0.9996
糙沙	180	1.87	224.18	228.82	0.28	0.36	0.9993
1轮	224	2.09	248.36	243.79	0.30	0.38	0.9991
2轮	251	1.48	297.16	293.01	0.50	0.27	0.9990
3轮	176	2.26	196.58	196.15	0.26	0.43	0.9994
4轮	212	2.71	235.18	236.52	0.15	0.51	0.9990
5轮	230	2.92	261.25	260.60	0.10	0.54	1.0000

门水平的主要细菌菌群结构

单位: %



醅细菌结构的特征。

7个轮次共有的细菌属为Lactobacillus、Acetobacter、Kroppenstedtia、Bacillus、Weissella、Acinetobacter、Pseudomonas、Pediococcus、Staphylococcus、Thermoactinomyces、Saccharopolyspora,在各轮次中,这些属的总占比为50.1%~98.1%。

其中,Lactobacillus(2.0%~63.7%)和Acetobacter(1.8%~58.9%)是7个轮次中的共有优势细菌属。Lactobacillus在下沙、糙沙、一轮中相对丰度为39.3%~63.7%,是7个轮次样品中平均相对丰度(23.2%)最高的优势细菌属。Acetobacter平均相对丰

度22.1%次之,其在造沙、一轮、二轮、三轮中的相对丰度为15.9%~58.9%。而Kroppenstedtia(1.5%~22.6%)、Bacillus(1.2%~13.9%)和Staphylococcus(1.0%~10.0%)是至少4个轮次中的优势细菌属。其中,Kroppenstedtia在四轮中的相对丰度为22.6%;Bacillus在下沙、四轮、五轮中的相对丰度均大于10%;Staphylococcus在四轮中的相对丰度为10.0%。另外,Weissella在下沙轮次的相对丰度为33.7%;Virgibacillus在三轮的相对丰度为29.1%;Arthrobacters在三轮的相对丰度为17.8%;Acinetobacter在五轮的相对丰度为23.9%;Pseudomonas在五轮的相对丰度为15.5%;

Pediococcus在下沙轮次的相对丰度为13.1%。

胡小霞等基于高通量测序,发现酱香型白酒堆积发酵过程优势细菌属有Lactobacillus等13个,其中,Lactobacillus、Escherichia-Shigella和BacillusVirgibacillus占主导地位^[5];张春林等采用高通量测序技术分析酱香型白酒二轮次堆积发酵酒醅,共检测出细菌125个属,优势细菌包括Bacillus、Lactobacillus、Oceanobacillus、Thermoactinomyces、Virgibacillus、Pediococcus等^[6];郭敏基于高通量测序发现酱香大曲中Kroppenstedtia、Oceanobacillus是其主要菌属^[7]。

(下转16版)