

基于宏基因组解析中温大曲成熟前后的微生物群落功能差异

刘文虎^{1,2,3,4}, 刘光钱^{3,4}, 张芮^{3,4}, 郑蕾^{3,4}, 陆震鸣^{1,2}, 张晓娟^{1,2}, 王松涛^{3,4}, 沈才洪^{3,4}, 史劲松⁵, 许正宏^{1,2,4}, 柴丽娟^{1,2*}

- 1 江南大学粮食发酵与食品生物制造国家工程研究中心, 江苏 无锡 214122
- 2 江南大学生物工程学院, 江苏 无锡 214122
- 3 泸州品创科技有限公司, 四川 泸州 646000
- 4 国家固态酿造工程技术研究中心, 四川 泸州 646000
- 5 江南大学生命科学与健康工程学院, 江苏 无锡 214122

刘文虎, 刘光钱, 张芮, 郑蕾, 陆震鸣, 张晓娟, 王松涛, 沈才洪, 史劲松, 许正宏, 柴丽娟. 基于宏基因组解析中温大曲成熟前后的微生物群落功能差异[J]. 生物工程学报, 2024, 40(3): 877-894.

LIU Wenhui, LIU Guangqian, ZHANG Rui, ZHENG Lei, LU Zhenming, ZHANG Xiaojuan, WANG Songtao, SHEN Caihong, SHI Jinsong, XU Zhengong, CHAI Lijuan. Metagenomics unveils the differences in the functions of microbial community of medium-temperature Daqu before and after maturation[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2024, 40(3): 877-894.

摘要: 大曲是白酒酿造中的糖化发酵剂和生香剂, 其成熟过程是获得高品质大曲的重要步骤。前期研究探索了大曲成熟前后的微生物群落组成和多样性, 但对微生物群落功能的变化缺乏深入研究。本文在分析中温大曲成熟前后酶活和挥发性化合物的基础上, 采用宏基因组学解析微生物群落组成和潜在功能的差异, 并探索酶活和重要挥发性化合物变化的微生物基础。结果显示, 大曲成熟后, 水分含量($P \leq 0.05$)、淀粉含量、液化力、糖化力($P \leq 0.05$)和发酵力降低, 而酸度和酯化力($P \leq 0.05$)升高; 同时, 其挥发性化合物组成变化显著($P = 0.001$), 芳香醇类和芳香酯类物质含量显著降低, 吡嗪类、酮类和高级脂肪醇类物质含量显著升高。成熟大曲中毛霉菌目(Mucorales, 34.8%–23.0%)和散囊菌目(Eurotiales, 34.3%–20.1%)等真菌相对丰度降低, 功能分析表明这降低了 α -淀粉酶、 α -葡萄糖苷酶、乙醇脱氢酶和乙醇脱氢酶(NADP⁺)的基因丰度($P > 0.05$), 导致大曲液化力($P > 0.05$)、糖化力($P \leq 0.05$)、发酵力($P > 0.05$)和苯乙醇等芳香醇类物质含量降低($P \leq 0.05$)。此外, 酵母菌目(Saccharomycetales, 2.9%–16.6%)、乳杆菌目(Lactobacillales, 14.9%–23.6%)和芽孢杆菌目(Bacillales, 0.8%–3.8%)等微生物的相对丰度升高, 使得乙酰基转移酶、羧酸酯酶、乙酰乳酸脱羧酶、R-乙偶

资助项目: 国家重点研发计划(2018YFE0127400); 国家自然科学基金(31901117); 四川省科技厅项目(2021ZYD0102)
This work was supported by the National Key Research and Development Program of China (2018YFE0127400), the National Natural Science Foundation of China (31901117), and the Project of the Science and Technology Department of Sichuan Province (2021ZYD0102).

*Corresponding author. E-mail: chailijuan2017@jiangnan.edu.cn

Received: 2023-05-05; Accepted: 2023-08-11; Published online: 2023-08-18

烟脱氢酶和 S-乙偶姻脱氢酶的基因丰度显著升高($P \leq 0.05$), 进而显著提高了大曲的酯化力和吡嗪类物质含量($P \leq 0.05$)。本文在基因水平解析了大曲成熟前后酶活和重要挥发性化合物变化的微生物基础, 可为理性调控大曲生产提供理论支撑。

关键词: 中温大曲; 成熟; 宏基因组学; 微生物群落结构与功能

Metagenomics unveils the differences in the functions of microbial community of medium-temperature Daqu before and after maturation

LIU Wenhui^{1,2,3,4}, LIU Guangqian^{3,4}, ZHANG Rui^{3,4}, ZHENG Lei^{3,4}, LU Zhenming^{1,2}, ZHANG Xiaojuan^{1,2}, WANG Songtao^{3,4}, SHEN Caihong^{3,4}, SHI Jinsong⁵, XU Zhenghong^{1,2,4}, CHAI Lijuan^{1,2*}

1 National Engineering Research Center for Cereal Fermentation and Food Biomanufacturing, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu, China

2 School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu, China

3 Luzhou Pinchuang Technology Co., Ltd., Luzhou 646000, Sichuan, China

4 National Engineering Research Center of Solid-State Brewing, Luzhou 646000, Sichuan, China

5 School of Life Sciences and Health Engineering, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu, China

Abstract: Daqu is the saccharifying, fermenting, and aroma-producing agent used in Baijiu brewing, and its maturation is crucial for obtaining high-quality Daqu. Previous studies have explored the microbial community composition and diversity before and after maturation. However, little is known about the changes in the functions of microbial community. In this study, based on the analyses of enzyme activities and volatile compounds of medium-temperature Daqu before and after maturation, metagenomics was used to analyze the differences in the composition of microbial community and the potential functions, with the aim to explore the microorganisms involved in changes in enzyme activities and important volatiles. The results showed that the moisture ($P \leq 0.05$), starch content, liquefying activity, saccharifying activity ($P \leq 0.05$), and fermentative activity decreased, while the acidity and esterifying activity ($P \leq 0.05$) increased after Daqu maturation. In the meantime, the composition of volatile compounds changed significantly ($P = 0.001$), with significant decreases in the contents of aromatic alcohols and esters as well as significant increases in the contents of pyrazines, ketones, and higher fatty alcohols. The relative abundances of Mucorales (34.8%–23.0%) and Eurotiales (34.3%–20.1%) decreased in matured Daqu, and functional predictions showed these changes decreased the gene abundances of α -amylase, α -glucosidase, alcohol dehydrogenase, and alcohol dehydrogenase (NADP⁺) ($P > 0.05$), resulting in lower levels of liquefying activity ($P > 0.05$), saccharifying activity ($P \leq 0.05$), fermentative activity ($P > 0.05$), as well as aromatic alcohols such as phenylethyl alcohol ($P \leq 0.05$). In addition, higher relative abundances of Saccharomycetales (2.9%–16.6%), Lactobacillales (14.9%–23.6%), and Bacillales (0.8%–3.8%)

were observed after maturation, and they were conducive to improving the gene abundances of alcohol O-acetyltransferase, carboxylesterase, acetolactate decarboxylase, (R)-acetoin dehydrogenase, and (S)-acetoin dehydrogenase ($P \leq 0.05$), resulting in significantly higher levels of esterifying activity and pyrazines ($P \leq 0.05$). The microorganisms involved in the changes in enzyme activities and important volatiles before and after Daqu maturation were studied at the gene level in this work, which may facilitate further rational regulation for Daqu production.

Keywords: medium-temperature Daqu; maturation; metagenomics; microbial community structure and function

大曲是中国传统固态酿造白酒的糖化发酵剂和生香剂,其含有多样的微生物菌群、丰富的酶类和风味物质及其前体^[1]。大曲的生产过程主要包括 5 个步骤:粉碎、混合、成型、自然发酵和成熟^[2]。在自然发酵过程中,来源于原料和环境的微生物(主要为细菌、酵母和丝状真菌等)在大曲中定殖、演替,逐渐形成相对稳定的群落结构,同时伴随着酶类和代谢产物的积累。发酵结束后,大曲需成熟 3 个月以上才能用于酿酒,长期生产实践表明成熟过程是获得高品质大曲的重要步骤^[3-4]。

前期研究探索了不同类型大曲成熟过程中微生物群落结构的变化。Fan 等^[3,5]采用扩增子测序分别分析了低温大曲和芝麻香大曲成熟过程中微生物群落结构变化,发现 2 种类型大曲在成熟后细菌群落中乳杆菌属(*Lactobacillus*)、魏斯氏菌属(*Weissella*)和葡萄球菌属(*Staphylococcus*)相对丰度均明显升高;两者真菌群落变化各异,低温大曲中复膜孢酵母属(*Saccharomycopsis*)和半乳糖霉属(*Galactomyces*)的相对丰度先降低后升高,芝麻香大曲中犁头霉属(*Absidia*)和根霉属(*Rhizopus*)相对丰度先升高后降低。何佳欢等^[6]发现陈放 6 个月后,中温大曲曲块内部高温放线菌属(*Thermoactinomyces*)、曲块外部芽孢杆菌属(*Bacillus*)和嗜热子囊菌属(*Thermoascus*)相对丰度升高。Guan 等^[7]采用扩增子测序研究

了浓香型白酒所用机械和传统大曲的成熟过程,发现机械大曲成熟 4-7 个月期间,芽孢杆菌属、片球菌属(*Pediococcus*)、魏斯氏菌属和葡萄球菌属的相对丰度陆续升高,机械大曲的根霉属、热子囊菌属是成熟过程的优势真菌,而传统大曲的优势真菌为毕赤酵母属(*Pichia*)和未分类酵母菌目(unclassified Saccharomycetales)。Zhang 等^[4]采用 PacBio 测序比较了成熟 3 个月和 6 个月的高温大曲,发现随着成熟期延长,高温放线菌属、类芽孢杆菌属(*Paenibacillus*)和罗萨氏菌属(*Rasamsonia*)相对丰度下降,而芽孢杆菌属、假单胞菌属(*Pseudomonas*)和热子囊菌属相对丰度明显上升。上述研究分析了大曲成熟过程中微生物群落组成变化,但大曲成熟过程对微生物群落功能的影响及理化性质变化的微生物基础尚不清楚。

因此,本研究以浓香型白酒中温大曲为研究对象,采用宏基因组学比较大曲成熟前后的微生物群落组成和潜在功能的差异性,从基因水平分析酶活和重要挥发性化合物变化的微生物基础,进而解析大曲成熟的作用及机理,为大曲的科学合理生产和应用提供理论支撑。

1 材料与方法

1.1 材料

发酵结束时(即发酵大曲, fermented Daqu)

和陈放 3 个月(即成熟大曲, matured Daqu)的大曲样品均采集于泸州老窖股份有限公司。每种大曲各收集 9 个生物学重复样本, 共计 18 个样本。

1.2 大曲理化指标分析

按照 QB/T 4257—2011《酿酒大曲通用分析方法》^[8]规定的方法检测大曲理化指标, 包括水分、可滴定酸度、淀粉含量、液化力、糖化力、发酵力和酯化力。

1.3 大曲挥发性化合物分析

按照实验室已报道的顶空固相微萃取/气相色谱-质谱联用方法(headspace solid phase microextraction/gas chromatograph-mass spectrometer, HS-SPME/GC-MS)进行挥发性化合物的检测和定性与定量分析^[9]。取 0.5 g 样品与 10 mL 饱和 NaCl 溶液混合于 20 mL 顶空瓶中, 加入 2 μ L 2-辛醇溶液(0.08 mg/mL, 内标)。采用 50/30 μ m DVB/CAR/PDMS 萃取头在 55 $^{\circ}$ C 条件下顶空萃取 35 min。气相色谱条件: DB-WAX 色谱柱(长度 30 m, 内径 0.32 mm, 膜厚 0.25 μ m; J&W Scientific); 载气为超高纯度氦气, 流速为 3 mL/min; 升温程序为 40 $^{\circ}$ C 保持 3.5 min, 再以 5 $^{\circ}$ C/min 加热到 60 $^{\circ}$ C, 随后以 10 $^{\circ}$ C/min 加热到 230 $^{\circ}$ C, 然后保持 8 min。质谱条件: 接口温度 250 $^{\circ}$ C, 离子源温度 230 $^{\circ}$ C, 电离方式 EI⁺, 质量扫描范围 33–500 *m/z*。采用 NIST 17 质谱库进行定性分析, 以内标峰面积为基础对各化合物进行定量分析。

1.4 大曲总 DNA 提取、文库构建及高通量测序分析

采用 Omega 公司的 Soil DNA Kit (Omega Bio-Tek)提取各样本的总 DNA, 并对提取的 DNA 进行质控和定量。采用标准的 Illumina TruSeq DNA 文库制备实验流程(Illumina TruSeq DNA Sample Preparation Guide, Illumina)构建测序文

库。鸟枪法宏基因组测序(shotgun metagenomics)由上海派森诺生物科技股份有限公司完成, 测序平台为 Illumina NovaSeq, 测序策略为双端 150 bp。

按照实验室已报道的方法进行宏基因组测序数据分析^[10]。首先, 将原始数据(raw data)筛选和过滤, 去除低质量序列后获得有效数据(clean data)进行后续分析。去除宿主序列后, 采用 Kaiju 软件的 Greedy 模式完成基于 reads 的物种注释^[11]。同时, 有效数据经过 *de novo* 组装、去冗余后获得非冗余重叠群序列(non-redundant contigs), 然后基于非冗余重叠群序列进行基因和蛋白质预测^[12]。蛋白序列聚类获得非冗余蛋白序列集(uniprotein set), 各蛋白序列的丰度与其对应的基因序列一致, 采用每千个碱基的转录每百万映射读取的转录本(transcripts per kilobase of exon model per million mapped reads, TPM)计算丰度。每个非冗余蛋白序列经与 KEGG、NCBI NR 数据库匹配分别获得其功能、物种注释信息。最后, 根据每个非冗余蛋白序列的功能和分类学信息总结微生物群落物种与功能的对应关系^[13]。

18 个大曲样品的宏基因组测序原始数据(raw data)已存储于国家基因组科学数据中心(National Genomics Data Center, <https://ngdc.cncb.ac.cn/gsa/>), 编号为 CRA010736。

1.5 数据分析与可视化

两种大曲理化指标、物种相对丰度以及代谢路径和酶基因丰度之间的差异显著性均采用 T 检验。采用 R 语言(<https://www.r-project.org/>)的 pheatmap 包进行挥发性化合物组成的热图绘制。主成分分析(principal component analysis, PCA)和主坐标分析(principal co-ordinates analysis, PCoA)均采用 R 语言的 vegan 和 ggplot2 包完成, 同时, 基于 Hellinger 距离矩阵的 Anosim 分析

(analysis of similarities, 相似性分析)采用 R 语言的 vegan 包完成, 置换次数为 999 次。线性判别分析分析(linear discriminant analysis effect size, LEfSe)采用“生科云”平台(<https://bioincloud.tech/>)完成。物种组成、功能组成和关键酶基因微生物来源的堆积柱状图均采用 Origin 2022b 软件绘制(<https://www.originlab.com/>)。

2 结果与分析

2.1 大曲成熟前后的理化性质

大曲成熟前后, 其各项理化指标均发生了不同程度的变化(表 1)。发酵大曲中水分含量($P \leq 0.05$)、淀粉含量、液化力、糖化力($P \leq 0.05$)和发酵力高于成熟大曲, 而成熟大曲的酸度和酯化力($P \leq 0.05$)较高。水分含量和酸度变化与低温大曲、芝麻香大曲、机械和传统中温大曲一致^[3,5,7], 酸度变化也与洋河中温大曲一致^[6], 但与成熟 3-6 个月期间高温大曲的变化规律相反^[4]。淀粉含量变化与机械和传统中温大曲一致^[7], 而低温大曲成熟前后淀粉含量无显著变化^[3], 芝麻香大曲的则持续显著升高^[5]。成熟前后液化力和糖化力的变化与芝麻香大曲、传统中温大曲一致, 但与机械中温大曲相反^[5,7]; 发酵力变化与芝麻香大曲、机械中温大曲一致, 与低温大曲、传统中温大曲相反^[3,5,7]; 酯化力变化与低温大曲、芝麻香大曲和传统中温大曲一致^[3,5,7]。整体上, 本研究中大曲成熟前后的各项理化指标变化规律与芝麻香大曲和传统中温大曲的最相近, 其次是机械中温大曲。说明不同类型大曲的成熟过程具有一定的相似性, 但也存在差异, 这可能是由于不同大曲的原料、生产工艺和储存环境等方面存在明显区别, 使其成熟前后理化性质的变化趋势不尽相同。

2.2 大曲成熟前后的挥发性化合物

大曲中挥发性化合物的形成是许多代谢反

表 1 发酵大曲和成熟大曲的理化指标

Table 1 The physicochemical parameters of fermented Daqu and matured Daqu

	Fermented Daqu ($\bar{x} \pm s, n=9$)	Matured Daqu ($\bar{x} \pm s, n=9$)
Moisture (%)	14.53±0.58*	13.28±0.50
Titrate acidity (mmol/g)	0.068±0.007	0.075±0.007 (NS)
Starch content (%)	61.63±2.84	59.23±2.39 (NS)
Liquefying activity (g/(g·h))	0.88±0.05	0.83±0.04 (NS)
Saccharifying activity (mg/(g·h))	826.70±35.20*	707.26±36.07
Fermentative activity (g/(g·h))	0.019±0.002	0.018±0.001 (NS)
Esterifying activity (mg/(g·d))	1.51±0.08	1.81±0.12*

The mark * represented a significant difference, and NS (not significant) represented no significant difference (significance level: 0.05).

应的结果, 它们受到大曲中微生物群落演替的影响^[3]。采用 HS-SPME/GC-MS 在两种大曲中检测到 62 种挥发性化合物, 包括 15 种醇类、17 种酯类、11 种醛类、4 种酮类、5 种芳香族类、5 种吡嗪类和 5 种其他类物质(图 1A)。大曲成熟前后挥发性化合物总量分别为(1 307.8±155.2) $\mu\text{g}/\text{kg}$ 和(1 374.4±298.4) $\mu\text{g}/\text{kg}$, 无显著性差异($P > 0.05$)。PCA 和 Anosim 分析显示两种大曲的挥发性化合物组成具有显著性差异($P = 0.001$) (图 1B)。

与成熟大曲相比, 发酵大曲中 23 种物质含量较高(图 1A), 其中 8 种是 LEfSe 分析显示的发酵大曲的标志性物质, 主要是芳香醇类和芳香酯类, 如苯乙醇(phenylethyl alcohol)、 β -乙基苯乙醇(2-phenyl-1-butanol)和异丙烯基乙醇(isopropenylethyl alcohol), 以及邻苯二甲酸二丁酯(dibutyl phthalate)和邻苯二甲酸二异丁酯(diisobutyl phthalate) (图 1C)。已有研究发现低温大曲、洋河中温大曲和高温大曲成熟前苯乙醇含量也高于成熟后^[3-4,6], 而芝麻香大曲成熟

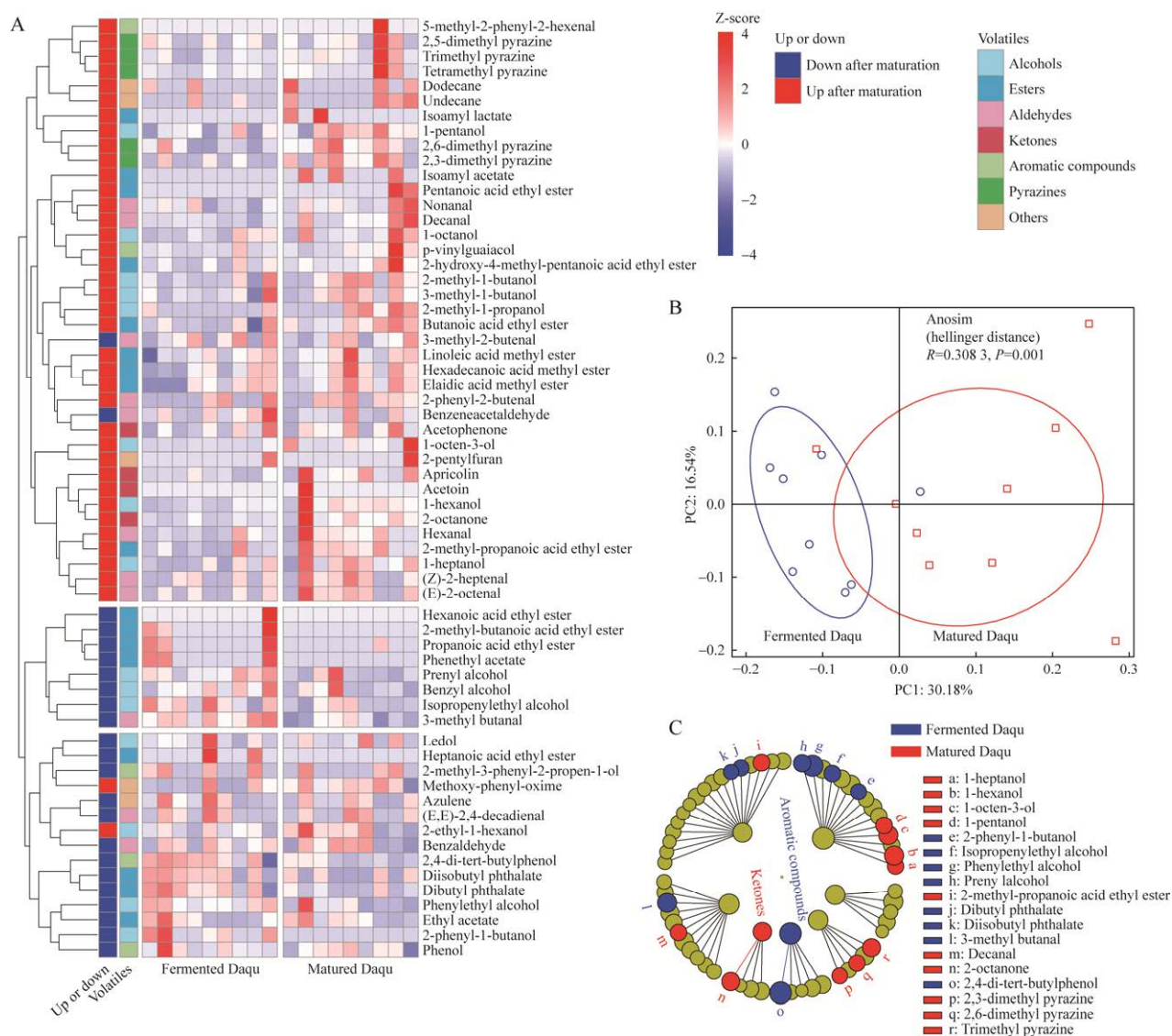


图 1 发酵大曲和成熟大曲的挥发性化合物组成物质含量热图(A)、PCA 分析(B)和 LefSe 分析(LDA \geq 3.0)(C)。图 C 中黄色节点表示大曲成熟前后无显著差异的挥发性化合物

Figure 1 The volatile compounds of fermented Daqu and matured Daqu. Heatmap (A), PCA analysis (B), and LefSe analysis with LDA \geq 3.0 (C). The yellow nodes in figure C represent the volatile compounds without significant differences before and after Daqu maturation.

后苯乙醇含量却显著升高^[5]。邻苯二甲酸酯类可作为增塑剂，被广泛应用于工业、医疗、生活等领域，但对人体健康有不良影响，因此，其含量在食品中具有严格的限制。大曲成熟后，邻苯二甲酸二丁酯和邻苯二甲酸二异丁酯的含量分别由(7.0 \pm 2.2) $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、(3.3 \pm 1.9) $\mu\text{g}/\text{kg}$ 降低

至(5.2 \pm 1.0) $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、(1.5 \pm 1.8) $\mu\text{g}/\text{kg}$ ，这可能源于大曲中微生物的生物降解作用等，目前已从各类环境中分离到邻苯二甲酸酯类的降解菌^[14-15]。然而，半定量分析结果无法判断这两种化合物是否超标，暂不能评估大曲中邻苯二甲酸酯类的可能风险。接下来，将首先排除采样袋和顶

空瓶垫片等塑料制品的影响,然后定性定量分析大曲中的邻苯二甲酸酯类。

大曲成熟后,绝大部分(39种)挥发性化合物含量呈升高趋势,包含所检到的5种吡嗪类和4种酮类物质(图1A),其中三甲基吡嗪(trimethyl pyrazine)、2,3-二甲基吡嗪(2,3-dimethyl pyrazine)、2,6-二甲基吡嗪(2,6-dimethyl pyrazine)和2-辛酮(2-octanone)也是LEfSe分析中发现的成熟大曲的标志性物质(图1C)。已有研究发现,洋河中温大曲成熟后三甲基吡嗪、四甲基吡嗪和2,3-二甲基吡嗪等吡嗪类含量普遍升高^[6],芝麻香大曲成熟后四甲基吡嗪含量显著升高^[5],成熟6个月的高温大曲中三甲基吡嗪和四甲基吡嗪含量也明显高于成熟3个月的^[4],而低温大曲成熟后四甲基吡嗪和2,3-二甲基吡嗪含量却显著降低^[3]。因此,大曲成熟后吡嗪类化合物含量升高是相对普遍的现象。另外,本文发现正戊醇(1-pentanol)、正己醇(1-hexanol)、1-辛烯-3-醇(1-octen-3-ol)和正庚醇(1-heptanol)这些高级脂肪醇类也是成熟大曲的标志性物质(图1C)。

2.3 大曲成熟前后的微生物群落组成

采用宏基因组学分析了大曲成熟前后的微生物群落组成,共获得189.9 Gb原始数据,质控后得到188.2 Gb有效数据用于后续分析。去除宿主序列后,这些有效数据共注释到480个目(3 432个属、14 422个种),且平均相对丰度top 10优势目(top 20优势属、top 20优势种)的累计相对丰度为93.6%(79.6%、59.3%)(图2)。在目水平,优势类群(平均相对丰度>2.3%)主要分布于毛霉菌目(Mucorales)、散囊菌目(Eurotiales)、酵母菌目(Saccharomycetales)、乳杆菌目(Lactobacillales)和芽孢杆菌目(Bacillales)(图2A、2B)。优势真菌属(平均相对丰度>2.1%)包括横梗霉属(*Lichtheimia*)、根霉属(*Rhizopus*)、曲霉属(*Aspergillus*)、拟青霉属(*Paecilomyces*)、

罗萨氏菌属(*Rasamsonia*)、毕赤酵母属(*Pichia*)、威克汉姆酵母属(*Wickerhamomyces*)和生丝毕赤酵母属(*Hyphopichia*)(图2C);优势细菌属(平均相对丰度>2.1%)包括魏斯氏菌属(*Weissella*)、明串珠菌属(*Leuconostoc*)、伴生乳杆菌属(*Companilactobacillus*)和粘液乳杆菌属(*Limosilactobacillus*)(图2D),与已报道的基于宏基因组学的中温大曲微生物群落组成基本一致^[10,13]。Yang等^[13]发现曲霉属、丝衣霉菌属(*Byssochlamys*)、罗萨氏菌属和横梗霉属等是大曲发酵中后期的优势真菌,另外,基于ITS的大曲真菌群落分析显示嗜热子囊菌属(*Thermoascus*)和嗜热真菌属(*Thermomyces*)为大曲发酵后期的优势真菌^[6,16-17]。本文与文献报道大曲真菌群落的差异,可能源于测序技术、分析软件和数据库的差异^[18]。ITS扩增子测序采用先扩增后测序,存在引物偏好性。宏基因组物种注释策略包括基于reads、基于拼接的方法,各有优缺点:基于reads的方法可快速注释物种,准确性和分类精确度高,且计算成本低、不同批次样品分析结果可以直接合并^[19];基于拼接的方法能减少高丰度物种的假阳性,同时可获得群落功能的微生物来源信息,但其分析结果很大程度上与拼接效果有关。Yang等^[13]采用基于拼接的方法,本文采用基于reads的方法为主、基于拼接的方法为辅开展宏基因组测序的物种注释。

基于大曲微生物群落组成的PCoA分析能区分两种大曲的样本点,但整体差异并不显著($P=0.128$, Anosim)(图3A),说明发酵结束时大曲微生物群落结构已经达到基本稳定的状态,成熟过程并不会显著改变其群落结构。整体上,两种大曲的微生物群落均以真菌为主,与之前的宏基因组学研究结果相符^[10,13],发酵大曲中毛霉菌目(34.8%)和散囊菌目(34.3%)相对丰度明显高于成熟大曲(毛霉菌目:23.0%、散囊菌目:

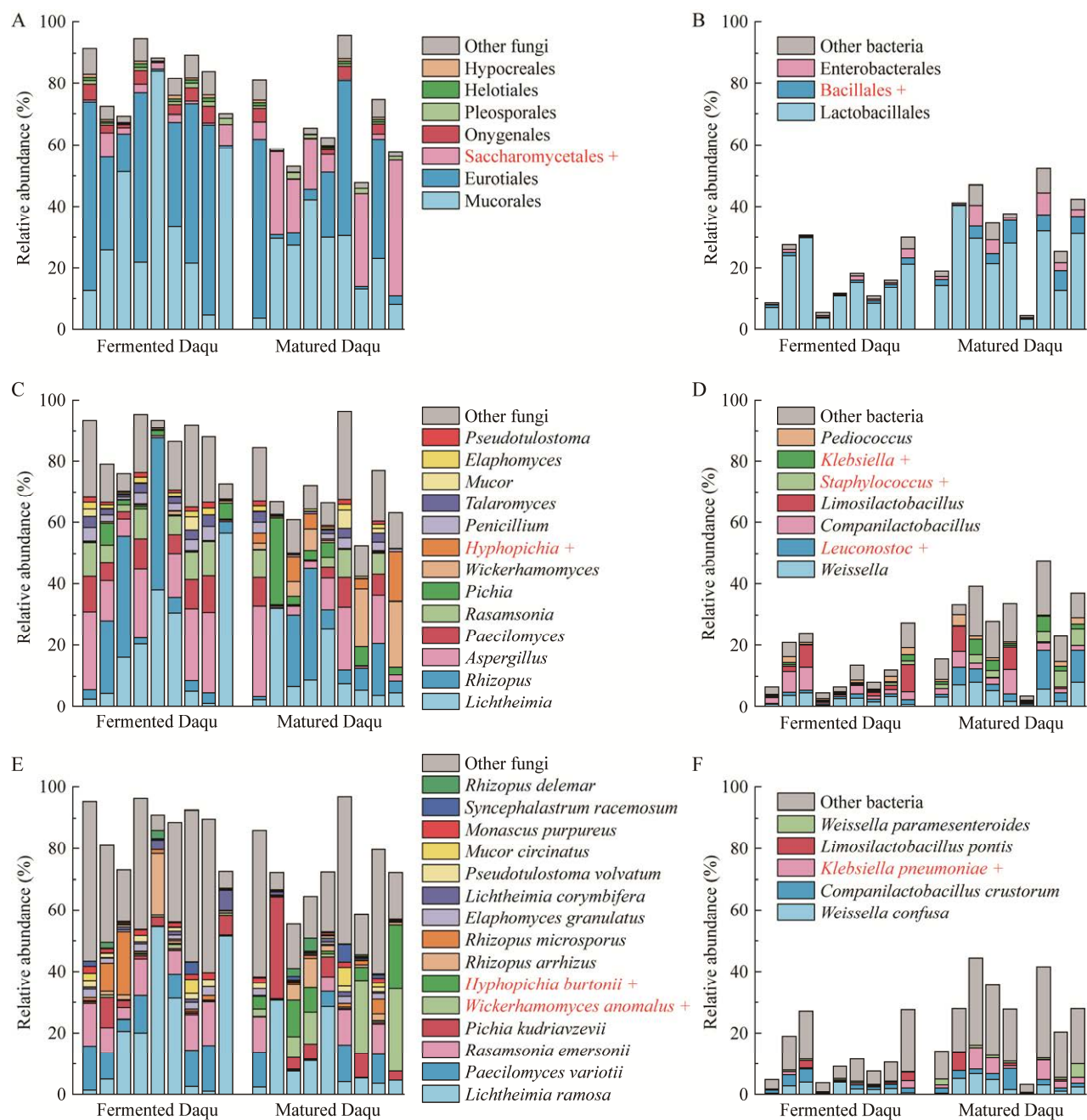


图 2 不同分类学水平上发酵大曲和成熟大曲的微生物群落组成 目水平真菌(A)和细菌(B)、属水平真菌(C)和细菌(D)、种水平真菌(E)和细菌(F). +和红色字体表示成熟大曲中相对丰度显著较高的微生物类群, $P \leq 0.05$

Figure 2 Microbial community compositions at different levels of fermented Daqu and matured Daqu. Fungal (A) and bacterial (B) communities at the order level, fungal (C) and bacterial (D) communities at the genus level, as well as fungal (E) and bacterial (F) communities at the species level. The mark + and red color represent the microbial groups with significantly higher relative abundance in matured Daqu (significance level: 0.05).

20.1%), 主要由于横梗霉属(发酵: 19.4%、成熟: 10.8%)、根霉属(14.9%、10.9%)、曲霉属(14.5%、9.4%)、拟青霉属(6.4%、3.3%)和罗萨氏菌属(6.1%、3.3%)等相对丰度较高, 但差异均无显著性($P>0.05$) (图 2A、2C)。发酵大曲中的优势真菌, 主要是总状横梗霉菌(*Lichtheimia ramosa*)、少根根霉菌(*Rhizopus arrhizus*)、小孢根霉菌(*Rhizopus microsporus*)、*Aspergillus sclerotialis*、温特曲霉菌(*Aspergillus wentii*)、宛氏拟青霉菌(*Paecilomyces variotii*)和埃默森罗萨氏菌(*Rasamsonia emersonii*)等(图2E), 它们基本都是多种水解酶的良好生产者, 如淀粉酶、糖化酶和蛋白酶等^[20], 使得发酵大曲具有良好的糖化和液化能力。成熟大曲(16.6%)中酵母菌目相对丰度显著高于发酵大曲(2.9%) ($P\leq 0.05$), 主要由于毕赤酵母属(成熟: 5.3%、发酵: 1.9%, $P>0.05$)、威克汉姆酵母属(6.2%、0.4%, $P>0.05$)和生丝毕赤酵母属(4.1%、0.1%, $P\leq 0.05$)相对丰

度较高(图 2A、2C)。其中, 酵母菌目和生丝毕赤酵母属也是 LEfSe 分析中成熟大曲的标志性真菌微生物(图 3B)。生丝毕赤酵母属, 主要是伯顿生丝毕赤酵母菌(*Hyphopichia burtonii*), 是一种非酿酒酵母, 可用于白酒酿造中, 能产淀粉酶、蛋白酶和脂肪酶等。酵母类微生物的相对丰度在低温大曲成熟后也呈升高趋势^[3], 它们还是机械和传统中温大曲成熟过程的优势真菌^[7], 但它们在高温大曲、芝麻香大曲、洋河中温大曲中的相对丰度很低或未检出^[4-6]。成熟大曲温度(室温)比发酵大曲低, 环境压力的缓解可能是成熟大曲具有较丰富酵母类微生物的原因之一, 如库德里阿兹威毕赤酵母菌(*Pichia kudriavzevii*)、异常威克汉姆酵母菌(*Wickerhamomyces anomalus*)和伯顿生丝毕赤酵母菌等(图 2E)。

此外, 成熟大曲中细菌类群的相对丰度普遍高于发酵大曲, 如乳杆菌目(成熟: 23.6%、发酵: 14.9%, $P>0.05$)和芽孢杆菌目(3.8%, 0.8%,

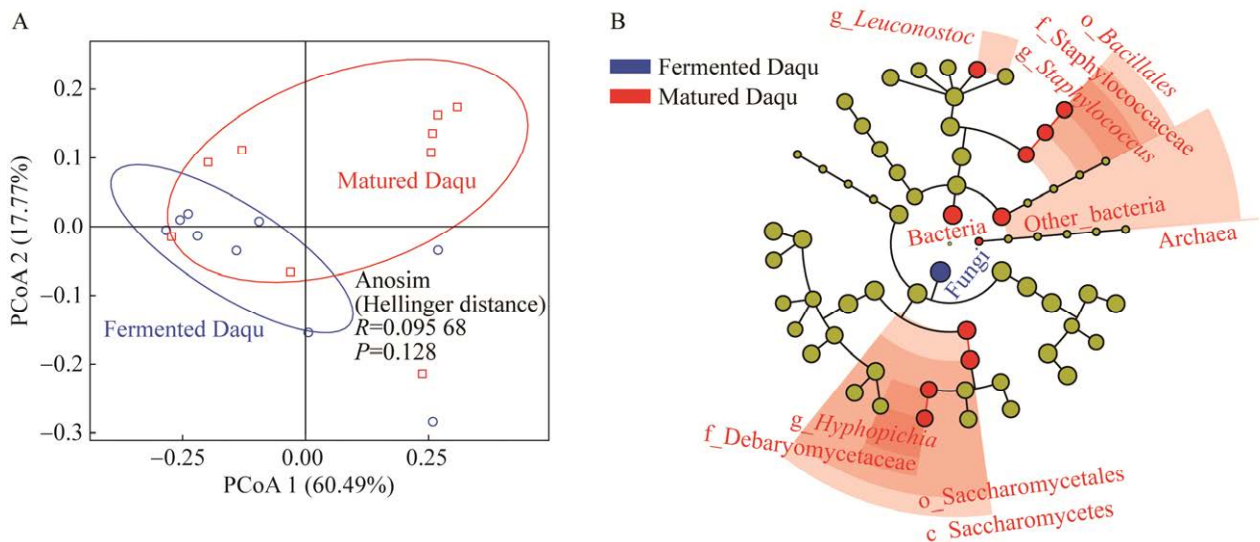


图 3 基于属水平微生物群落组成的 PCoA 分析(A)和基于 top 20 属的 LEfSe 分析(LDA \geq 3.0) (B) 图 B 中黄色节点表示大曲成熟前后无显著差异的微生物类群

Figure 3 PCoA analysis of microbial community composition at the genus level (A) and LEfSe analysis based on major (top 20) genera with LDA \geq 3.0 (B). The yellow nodes in figure B represent the microbial groups without significant differences before and after Daqu maturation.

$P \leq 0.05$)等细菌目,以及魏斯氏菌属(4.6%, 2.4%, $P > 0.05$)、明串珠菌属(4.6%, 0.9%, $P \leq 0.05$)和葡萄球菌属(*Staphylococcus*, 2.4%, 0.4%, $P \leq 0.05$)等细菌属(图 2B、2D)。其中,芽孢杆菌目、葡萄球菌属和明串珠菌属是成熟大曲的标志性细菌微生物(图 3B)。这与其他大曲成熟后乳酸菌类群、芽孢杆菌类群相对丰度普遍升高相符^[3-7],乳酸菌类群产生乳酸可能是大曲成熟后酸度升高的原因之一(表 1)。

2.4 大曲成熟前后的微生物群落潜在功能

去宿主序列后的有效数据共组装得到 1 494 145 条非冗余重叠群序列,其 N50 长度为 1 380 bp,进一步预测得到 819 244 条非冗余蛋白序列。其中,294 847 条非冗余蛋白序列共注释到 9 677 个 KO (KEGG orthology)。基于所有 KO 的 PCA 分析能区分两种大曲的样本点,且差异具有显著性($P=0.05$, Anosim) (图 4A),表明大曲成熟后,虽然其微生物群落组成基本保持稳定状态,但其微生物群落的潜在功能却处于变化状态。针对考察的 25 个 KEGG level 2 途径,发酵大曲中有 10 个途径的基因相对丰度高于成熟大曲,如能量代谢(energy metabolism)、脂质代谢(lipid metabolism)和异源物生物代谢和降解(xenobiotics biodegradation and metabolism)等,但差异均无显著性($P > 0.05$) (图 4C)。活跃的能量代谢与发酵大曲刚经历高温发酵环境相符,而成熟大曲处于室温环境,其微生物群落已经不再产生大量生物热。

成熟大曲中碳水化合物代谢(carbohydrate metabolism)、核苷酸代谢(nucleotide metabolism)、聚糖生物合成和代谢(glycan biosynthesis and metabolism)和萜类和聚酮类代谢(metabolism of terpenoids and polyketides)的基因相对丰度显著高于发酵大曲($P \leq 0.05$) (图 4C),它们也是 LEfSe 分析中成熟大曲的标志性途径(图 4B)。这些代

谢途径基本涵盖了微生物群落的初级代谢、次级代谢,可能负责丰富、平衡成熟大曲的代谢谱,突出其特征性风味。另外,成熟大曲中原核生物细胞群落(cellular community-prokaryotes)基因相对丰度显著高于发酵大曲($P \leq 0.05$) (图 4D),这与成熟大曲中细菌类群的相对丰度普遍较高相符。

2.5 大曲成熟前后关键酶的微生物来源

理化指标和代谢组学分析显示,大曲成熟过程中其酶活、挥发性化合物组成发生了显著的变化(表 1 和图 1)。已有研究主要采用相关性分析(如 Spearman 相关性)探究微生物群落组成与理化性质、环境因素等的关联性^[3,5-7]。因此,本文聚焦大曲酶活(即液化力、糖化力、发酵力和酯化力)和重要挥发性化合物(即苯乙醇和吡嗪类)代谢相关的关键酶,在基因水平上研究大曲成熟前后群落功能差异的微生物基础(图 5-8),以期从微生物群落功能视角理解大曲成熟的机理。

与液化力相关的关键酶主要有糖原磷酸化酶(glycogen phosphorylase, EC: 2.4.1.1)、 α -淀粉酶(α -amylase, EC: 3.2.1.1)、 β -淀粉酶(β -amylase, EC: 3.2.1.2)和 γ -淀粉酶(也称葡萄糖淀粉酶, glucoamylase, EC: 3.2.1.3)等。发酵大曲中 α -淀粉酶基因的丰度较高($P > 0.05$),成熟大曲中糖原磷酸化酶($P \leq 0.05$)、 γ -淀粉酶($P > 0.05$)基因的 TPM 值较高(图 5A-5C),未注释到与 β -淀粉酶相关的非冗余蛋白序列。根据各酶对应非冗余蛋白序列的物种注释信息,糖原磷酸化酶主要来源于横梗霉属、根霉属、曲霉属等真菌,以及魏斯氏菌属等细菌(图 5A); α -淀粉酶主要源自真菌类微生物,如曲霉属、拟青霉属、横梗霉属和罗萨氏菌属等(图 5B); γ -淀粉酶也主要来源于真菌类微生物,如横梗霉属、根霉属、曲霉属、根毛霉属(*Rhizomucor*)和拟青霉属等

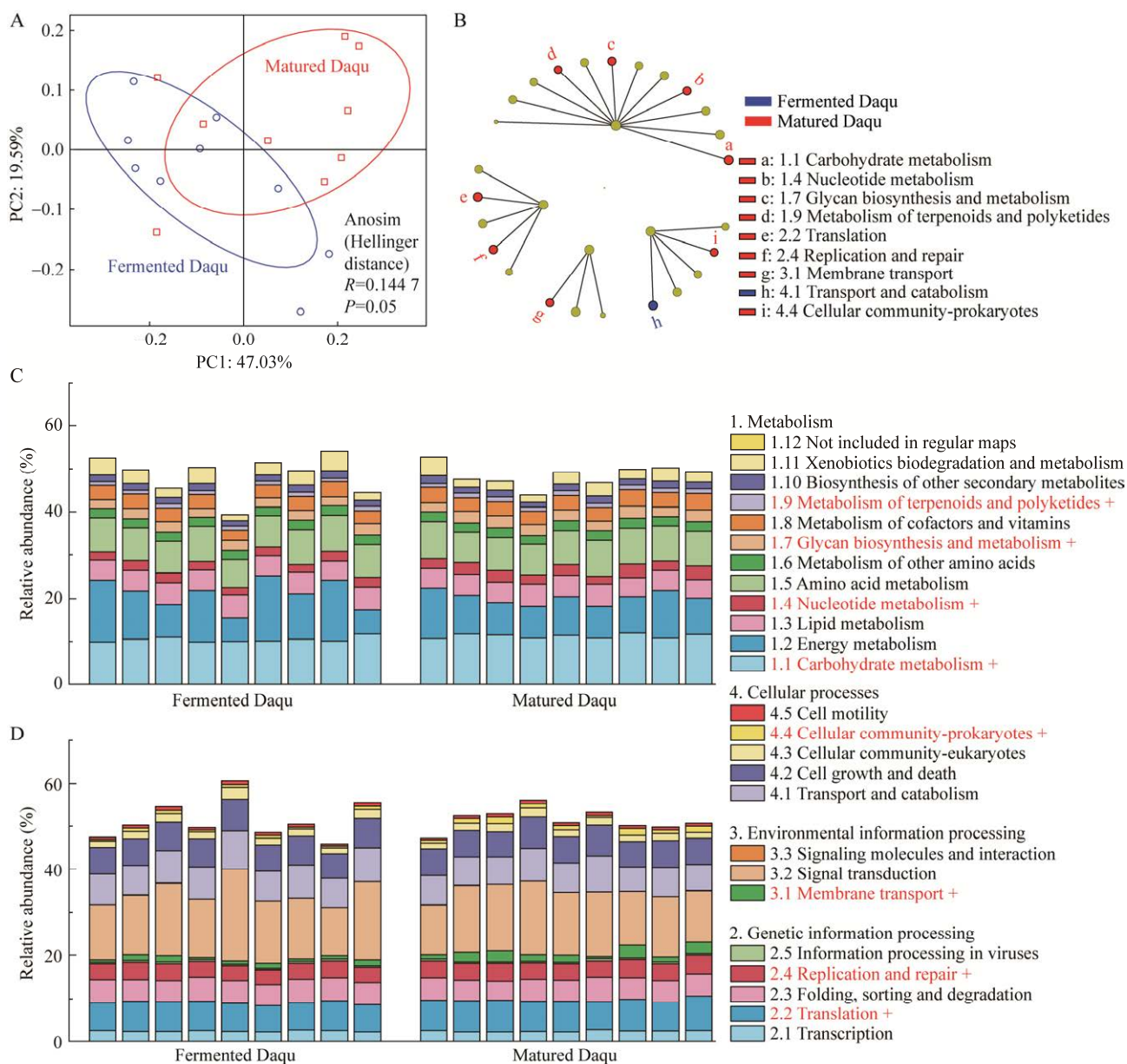


图 4 基于 KO 组成的 PCA 分析(A), KEGG pathway L2 水平上发酵大曲和成熟大曲的微生物群落潜在功能 LefSe 分析(LDA ≥ 3.0) (B)和潜在功能组成(C和 D) 图 B 中黄色节点表示大曲成熟前后无显著差异的代谢途径。代谢(metabolism)相关途径(C), 遗传信息处理(genetic information processing)、环境信息处理(environmental information processing)和细胞过程(cellular processes)相关途径(D). +和红色字体表示成熟大曲中相对丰度显著较高的途径, $P \leq 0.05$

Figure 4 PCA analysis at the KO level (A), LefSe analysis with LDA ≥ 3.0 (B) and the compositions (C and D) of microbial community potential function in fermented Daqu and matured Daqu at the KEGG pathway L2 level. The yellow nodes in figure B represent the pathways without significant differences before and after Daqu maturation. Pathways related to metabolism (C) and pathways related to genetic information processing, environmental information processing, and cellular processes (D). The mark + and red color represent the pathways with significantly higher relative abundance in matured Daqu (significance level: 0.05).

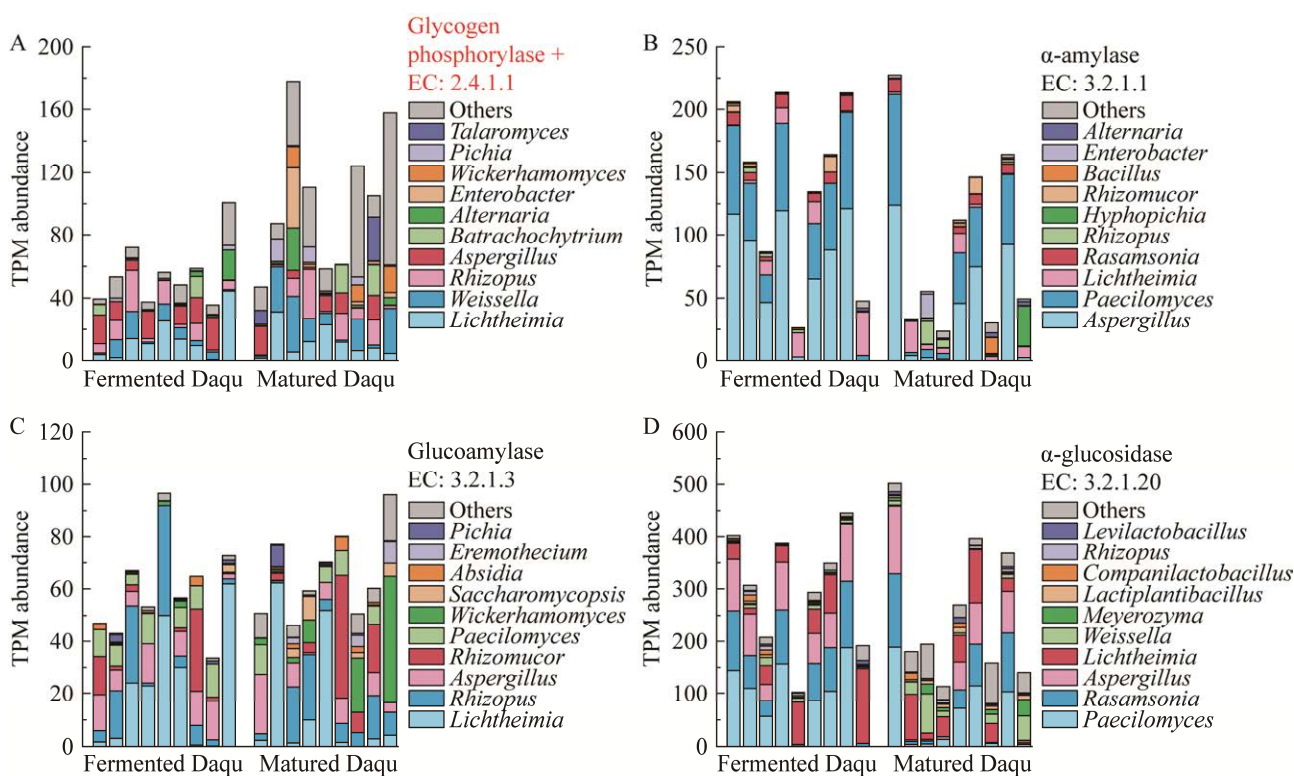


图5 与液化力、糖化力相关酶的基因丰度及微生物来源 糖原磷酸化酶(EC: 2.4.1.1) (A), α -淀粉酶(EC: 3.2.1.1) (B), γ -淀粉酶(EC: 3.2.1.3) (C)和 α -葡萄糖苷酶(EC: 3.2.1.20) (D). +和红色字体表示成熟大曲中 TPM 显著较高的酶, $P \leq 0.05$

Figure 5 The TPM abundances and microbial sources of key enzymes related to liquefying and saccharifying activities. Glycogen phosphorylase (EC: 2.4.1.1) (A), α -amylase (EC: 3.2.1.1) (B), glucoamylase (EC: 3.2.1.3) (C), and α -glucosidase (EC: 3.2.1.20) (D). The mark + and red color represent the enzymes with significantly higher TPM abundance in matured Daqu (significance level: 0.05).

(图 5C)。发酵大曲中更高相对丰度的曲霉属和拟青霉属有助于提高 α -淀粉酶的基因丰度, 使其液化力较高($P > 0.05$) (图 2C、5B 和表 1), 报道显示这些真菌产生的 α -淀粉酶通常具有良好的耐热性能^[21]。横梗霉属、根霉属和曲霉属为两种大曲贡献了大部分的糖原磷酸化酶和 γ -淀粉酶, 且贡献的基因丰度在大曲成熟前后无显著变化(图 5A、5C)。成熟大曲中更高基因丰度的糖原磷酸化酶可能源于魏斯氏菌属和酵母类微生物, 如威克汉姆酵母属和毕赤酵母属(图 5A)。酵母类微生物还能为成熟大曲提供一定的 γ -淀粉酶, 如威克汉姆酵母属和复膜孢酵

母属(*Saccharomycopsis*) (图 5C)。

糖化力涉及的酶不仅包括以淀粉为底物的 α - β - γ -淀粉酶等, 还包括以淀粉水解中间产物为底物的多种酶类, 其中基因丰度最高的是以麦芽糖、蔗糖为底物的 α -葡萄糖苷酶(α -glucosidase, EC: 3.2.1.20) (图 5D)。 α -葡萄糖苷酶主要源于真菌类微生物, 如拟青霉属、罗萨氏菌属、曲霉属和横梗霉属等, 它们在发酵大曲中均具有更高的相对丰度($P > 0.05$), 使其 α -葡萄糖苷酶基因丰度($P > 0.05$)和糖化力较高($P \leq 0.05$) (图 2C、5D 和表 1)。

白酒酿造的基础是酒精发酵, 发酵力用于

考察大曲微生物的产酒能力,涉及的关键酶有乙醇脱氢酶(alcohol dehydrogenase, EC: 1.1.1.1)和乙醇脱氢酶(NADP⁺) [alcohol dehydrogenase (NADP⁺), EC: 1.1.1.2]。乙醇脱氢酶主要源自罗萨氏菌属、曲霉属、青霉属(*Penicillium*)和拟青霉属等真菌,乙醇脱氢酶(NADP⁺)主要源于根霉属、罗萨氏菌属、横梗霉属、篮状菌属(*Talaromyces*)和曲霉属等真菌(图 6A、6B)。发酵大曲中更高相对丰度的毛霉菌目和散囊菌目类群有助于提高其乙醇脱氢酶和乙醇脱氢酶(NADP⁺)基因丰度($P>0.05$),这与发酵大曲具有

较高发酵力相符($P>0.05$),并可能是发酵大曲含有更丰富芳香醇类化合物的原因之一(图 1C、图 6A、6B 和表 1)。

酯化力用于考察大曲催化己酸和乙醇酯化反应生成己酸乙酯的能力。乙酯类物质主要由乙酰基转移反应以及有机酸和乙醇的缩合反应产生^[22]。催化乙酰基转移的乙酰基转移酶(alcohol O-acetyltransferase, EC: 2.3.1.84)源自威克汉姆酵母属和酿酒酵母属(*Saccharomyces*) (图 6C),而催化酸与醇酯化反应的羧酸酯酶(carboxylesterase, EC: 3.1.1.1)主要源于乳杆菌

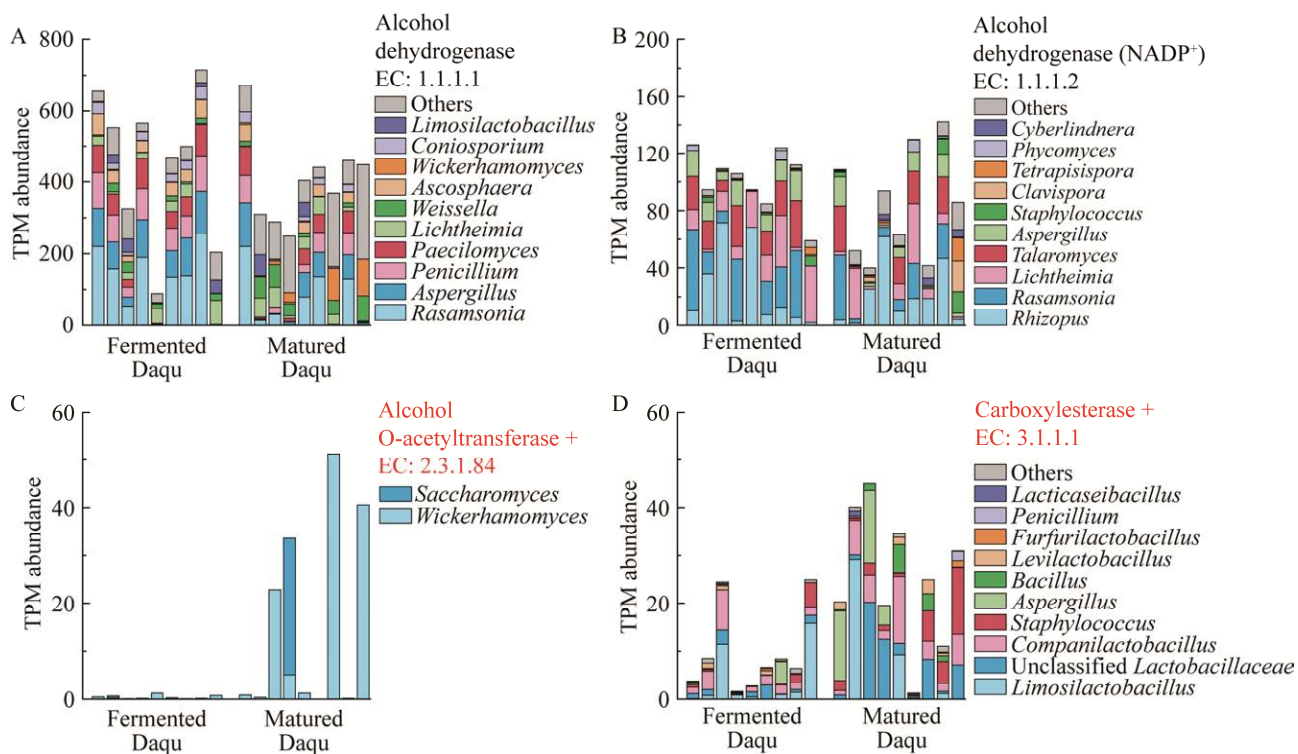


图 6 与发酵力、酯化力相关酶的基因丰度及微生物来源 乙醇脱氢酶(EC: 1.1.1.1) (A), 乙醇脱氢酶(NADP⁺) (EC: 1.1.1.2) (B), 醇乙酰基转移酶(EC: 2.3.1.84) (C)和羧酸酯酶(EC: 3.1.1.1) (D). +和红色字体表示成熟大曲中 TPM 显著较高的酶, $P\leq 0.05$

Figure 6 The TPM abundances and microbial sources of key enzymes related to fermentative and esterifying activities. Alcohol dehydrogenase (EC: 1.1.1.1) (A), alcohol dehydrogenase (NADP⁺) (EC: 1.1.1.2) (B), alcohol O-acetyltransferase (EC: 2.3.1.84) (C), and carboxylesterase (EC: 3.1.1.1) (D). The mark + and red color represent the enzymes with significantly higher TPM abundance in matured Daqu (significance level: 0.05).

目和芽孢杆菌目微生物, 如粘液乳杆菌属、未分类乳杆菌科(unclassified Lactobacillaceae)、伴生乳杆菌属、葡萄球菌属和芽孢杆菌属(*Bacillus*)等(图 6D)。成熟大曲中更高相对丰度的酵母菌目可产生较多的乙酰基转移酶, 乳杆菌目和芽孢杆菌目则可产生较多的羧酸酯酶, 共同使其酯化力显著较高($P \leq 0.05$) (图 6C、6D 和表 1)。

苯乙醇是挥发性化合物中含量第二高的物质, 是一种具有玫瑰花香味的芳香醇, 因其具有温和的、淡雅的玫瑰花般的气味被认为是食品和化妆品工业中的重要香料成分^[23]。苯乙醇

可由莽草酸途径、艾氏途径(Ehrlich pathway)和苯乙胺途径合成, 前两者均会生成苯丙酮酸, 然后经苯乙醛合成苯乙醇, 而苯乙胺途径可直接生产苯乙醛^[23]。催化苯丙酮酸脱羧生成苯乙醛的苯丙酮酸脱羧酶(phenylpyruvate decarboxylase, EC: 4.1.1.-)源自酵母菌目微生物, 如毕赤酵母属、迈耶氏酵母属(*Meyerozyma*)和棒孢酵母属(*Clavispora*)等(图 7A), 该脱羧酶是艾氏途径的关键酶, 而艾氏途径是微生物合成苯乙醇的首选途径, 广泛存在于多种酵母中^[24-25]。苯乙醛还可由乙醛脱氢酶[NAD(P)⁺] (aldehyde dehydrogenase

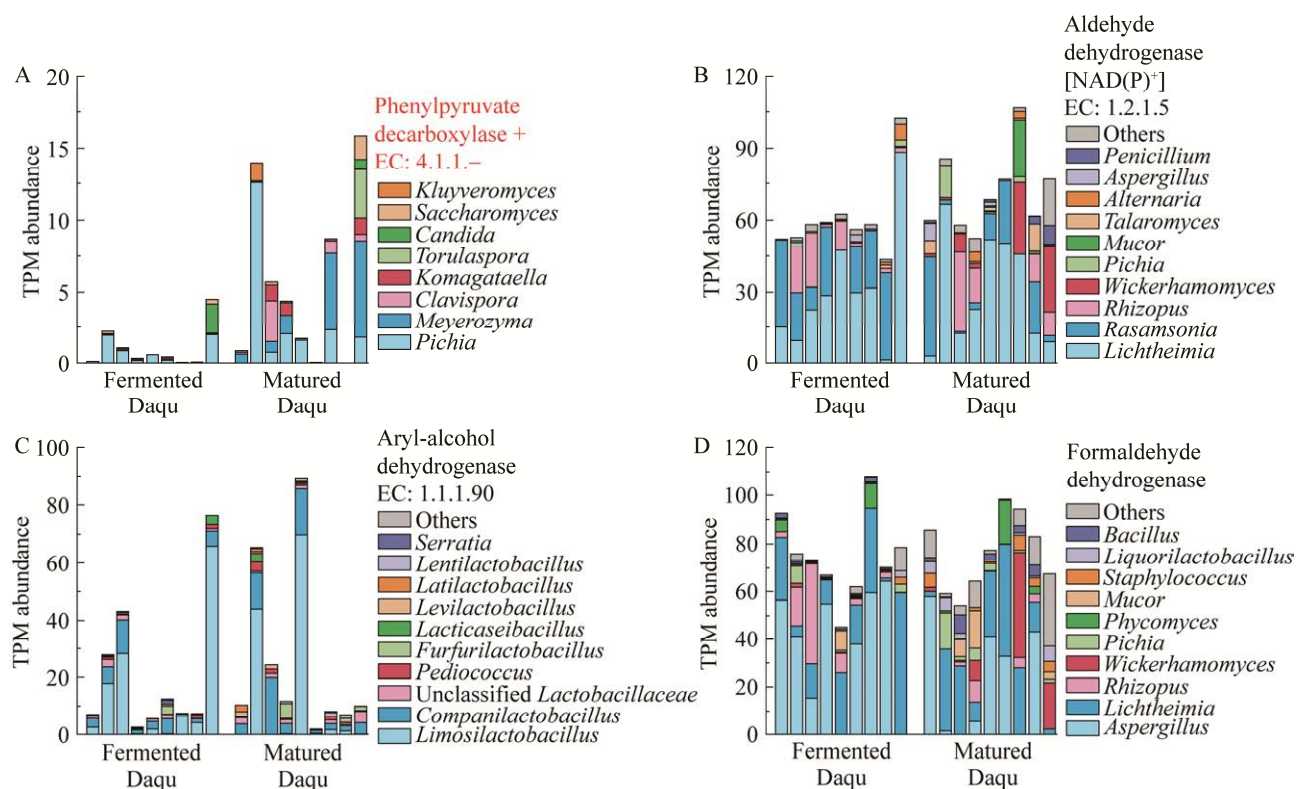


图7 与苯乙醇代谢相关酶的基因丰度及微生物来源 苯丙酮酸脱羧酶(EC: 4.1.1.-) (A), 乙醛脱氢酶[NAD(P)⁺] (EC: 1.2.1.5) (B), 芳基醇脱氢酶(EC: 1.1.1.90) (C)和甲醛脱氢酶(D). +和红色字体表示成熟大曲中 TPM 显著较高的酶, $P \leq 0.05$

Figure 7 The TPM abundances and microbial sources of key enzymes related to phenylethyl alcohol metabolism. Phenylpyruvate decarboxylase (EC: 4.1.1.-) (A), aldehyde dehydrogenase [NAD(P)⁺] (EC: 1.2.1.5) (B), aryl-alcohol dehydrogenase (EC: 1.1.1.90) (C), and formaldehyde dehydrogenase (D). The mark + and red color represent the enzymes with significantly higher TPM abundance in matured Daqu (significance level: 0.05).

NAD(P)⁺, EC: 1.2.1.5)催化苯乙酸脱羟基生成, 该酶主要源于横梗霉属、罗萨氏菌属、根霉属、威克汉姆酵母属和毕赤酵母属等(图 7B)。催化苯乙醛合成苯乙醇的芳基醇脱氢酶(aryl-alcohol dehydrogenase, EC: 1.1.1.90)主要源自乳杆菌目微生物, 如粘液乳杆菌属、伴生乳杆菌属、未分类乳杆菌科等(图 7C)。另外, 有报道显示乙醇脱氢酶和甲醛脱氢酶(formaldehyde dehydrogenase)也可完成由醛向长链或复杂醇的转化^[26], 其中甲醛脱氢酶主要源于曲霉属、横梗霉属、根霉属、威克汉姆酵母属和毕赤酵母属等(图 7D)。苯丙酮酸脱羧酶($P \leq 0.05$)、乙醛脱氢酶[NAD(P)⁺] ($P > 0.05$)、芳基醇脱氢酶($P > 0.05$)和甲醛脱氢酶($P > 0.05$)的基因丰度在发酵大曲中均低于成熟大曲(图 7), 但发酵大曲苯乙醛、苯乙醇含量较高(图 1A), 可能因为发酵大曲中较高丰度的乙醇脱氢酶催化了苯乙醛的还原反应(图 6A、6B)。

吡嗪类化合物能为大曲提供坚果味、烘焙味和烘烤味等风味^[27], 其合成代谢的关键中间产物为乙偶姻。由丙酮酸生成乙偶姻的关键酶主要有乙酰乳酸合酶(acetolactate synthase, EC: 2.2.1.6)、乙酰乳酸脱羧酶(acetolactate decarboxylase, EC: 4.1.1.5)、R-乙偶姻脱氢酶[(R)-acetoin dehydrogenase, EC: 1.1.1.303]和S-乙偶姻脱氢酶[(S)-acetoin dehydrogenase, EC: 1.1.1.304]等。乙酰乳酸合酶主要源于横梗霉属、根霉属、拟青霉属和魏斯氏菌属等(图 8A); 乙酰乳酸脱羧酶主要源自乳杆菌目和芽孢杆菌目微生物, 如魏斯氏菌属、明串珠菌属、伴生乳杆菌属、粘液乳杆菌属、葡萄球菌属和芽孢杆菌属等(图 8B)。有研究显示只有细菌(主要是芽孢杆菌科和乳杆菌科)具有产乙酰乳酸脱羧酶的能力, 酵母、丝状真菌等真核生物均不产该酶, 该酶常被应用于啤酒发酵中抑制乙酰乳酸的

非酶氧化脱羧反应, 进而控制双乙酰的含量^[28]。R-乙偶姻脱氢酶和S-乙偶姻脱氢酶则主要由乳杆菌目和酵母菌目微生物产生, 如明串珠菌属、塞伯林德纳氏酵母属(*Cyberlindnera*)和威克汉姆酵母属等产生前者, 魏斯氏菌属、威克汉姆酵母属、明串珠菌属和粘液乳杆菌属等产生后者(图 8C、8D)。有报道显示乙偶姻可由酵母合成, 其可作为酵母菌株分化的生物标志物, 但多数种类酵母的乙偶姻产量远低于 1 g/L, 细菌是最佳的乙偶姻生产者(最高达 75.2 g/L), 代表细菌有芽孢杆菌属、乳酸菌、多粘类芽孢杆菌(*Paenibacillus polymyxa*)和肠杆菌科微生物(*Enterobacteriaceae*)^[29]。成熟大曲中更高相对丰度的乳杆菌目、芽孢杆菌目和酵母菌目微生物, 显著提高了乙酰乳酸脱羧酶、R-乙偶姻脱氢酶和S-乙偶姻脱氢酶的基因丰度($P \leq 0.05$) (图 8B-8D), 进而促进乙偶姻和吡嗪类物质的积累(图 1A)。

3 结论

本文比较了中温大曲成熟前后关键酶活力、挥发性化合物组成、微生物群落结构与潜在功能的差异。结果表明, 整体上, 大曲成熟后, 尽管其挥发性化合物总量和微生物群落组成无显著变化($P > 0.05$), 但其酶活、挥发性化合物组成和微生物群落功能均发生了显著改变($P \leq 0.05$)。成熟前大曲(即发酵大曲)含有更高相对丰度的毛霉菌目和散囊菌目等真菌, 如横梗霉属、根霉属、曲霉属、拟青霉属和罗萨氏菌属等($P > 0.05$), 提高了 α -淀粉酶、 α -葡萄糖苷酶、乙醇脱氢酶和乙醇脱氢酶(NADP⁺)的基因丰度($P > 0.05$), 使其具有较高的液化力($P > 0.05$)、糖化力($P \leq 0.05$)、发酵力($P > 0.05$), 以及苯乙醇等芳香醇类物质含量($P \leq 0.05$)。

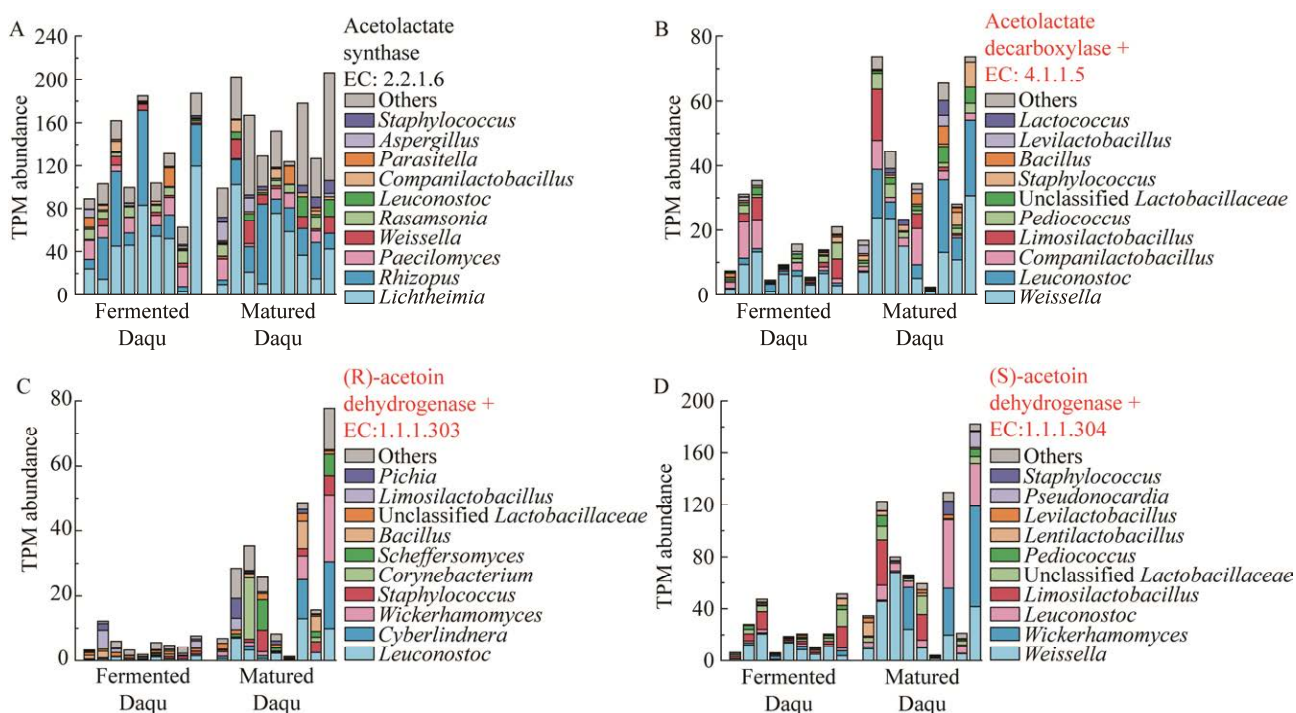


图8 与吡嗪代谢相关酶的基因丰度及微生物来源 乙酰乳酸合酶(EC: 2.2.1.6) (A), 乙酰乳酸脱羧酶(EC: 4.1.1.5) (B), R-乙偶姻脱氢酶(EC: 1.1.1.303) (C)和 S-乙偶姻脱氢酶(EC: 1.1.1.304) (D)。+和红色字体表示成熟大曲中 TPM 显著较高的酶, $P \leq 0.05$

Figure 8 The TPM abundances and microbial sources of key enzymes related to pyrazines metabolism. Acetolactate synthase (EC: 2.2.1.6) (A), acetolactate decarboxylase (EC: 4.1.1.5), (R)-acetoin dehydrogenase (EC: 1.1.1.303) (C), and (S)-acetoin dehydrogenase (EC: 1.1.1.304) (D). The mark + and red color represent the enzymes with significantly higher TPM abundance in matured Daqu (significance level: 0.05).

成熟后大曲则含有更高相对丰度的酵母菌目、乳杆菌目和芽孢杆菌目等微生物, 如毕赤酵母属、威克汉姆酵母属、生丝毕赤酵母属、魏斯氏菌属、明串珠菌属和葡萄球菌属等, 其碳水化合物代谢、核苷酸代谢、聚糖生物合成和代谢, 以及萜类和聚酮类代谢等途径的基因相对丰度显著高于发酵大曲($P \leq 0.05$)。成熟后大曲中较高相对丰度的酵母菌目、乳杆菌目和芽孢杆菌目类群有利于提高乙酰基转移酶、羧酸酯酶、乙酰乳酸脱羧酶、R-乙偶姻脱氢酶和 S-乙偶姻脱氢酶的基因丰度($P \leq 0.05$), 使其酯化力和吡嗪类物质含量显著提高($P \leq 0.05$)。此外, 大曲成熟后, 水分含量、淀粉含量和芳香酯类物质含

量均明显降低, 而酸度、高级脂肪醇类和酮类物质含量则明显升高。综上, 本文分析了大曲成熟的作用及其机理, 从群落功能视角解析大曲成熟前后酶活和挥发性化合物变化的微生物基础, 为大曲的科学合理生产和应用提供理论支撑。

REFERENCES

- [1] ZOU W, ZHAO CQ, LUO HB. Diversity and function of microbial community in Chinese strong-flavor Baijiu ecosystem: a review[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2018, 9: 671.
- [2] KANG JM, XUE YS, CHEN XX, HAN BZ. Integrated multi-omics approaches to understand microbiome assembly in Jiuqu, a mixed-culture starter[J].

- Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 2022, 21(5): 4076-4107.
- [3] FAN GS, FU ZL, SUN BG, ZHANG YH, WANG XL, XIA YQ, HUANG MQ, LI XT. Roles of aging in the production of light-flavored Daqu[J]. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2019, 127(3): 309-317.
- [4] ZHANG YD, XU JG, JIANG YL, NIU J, CHEN XX, HAN BZ. Microbial characteristics and metabolite profiles of high-temperature Daqu in different maturation stages[J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2022, 38(12): 1-11.
- [5] FAN GS, FU ZL, TENG C, LIU PX, WU QH, RAHMAN MKR, LI XT. Effects of aging on the quality of roasted sesame-like flavor Daqu[J]. BMC Microbiology, 2020, 20(1): 1-16.
- [6] 何佳欢, 柴丽娟, 张龙云, 高涛, 陆震鸣, 许正宏. 中温大曲陈放前后的理化性质及菌群结构差异[J]. 应用与环境生物学报, 2022, 28(5): 1304-1311.
- HE JH, CHAI LJ, ZHANG LY, GAO T, LU ZM, XU ZH. Differences in the physicochemical properties and microbial community structure of medium-temperature Daqu before and after aging[J]. Chinese Journal of Applied and Environmental Biology, 2022, 28(5): 1304-1311 (in Chinese).
- [7] GUAN TW, YANG H, OU MY, ZHANG JX. Storage period affecting dynamic succession of microbiota and quality changes of strong-flavor Baijiu Daqu[J]. LWT, 2021, 139: 110544.
- [8] 中华人民共和国工业和信息化部. 酿酒大曲通用分析方法: QB/T 4257—2011[S]. 北京: 中国轻工业出版社, 2011.
- Ministry of Industry and Information Technology of the People's Republic of China. General methods of analysis for Daqu: QB/T 4257—2011[S]. Beijing: China Light Industry Press, 2011 (in Chinese).
- [9] XIAO C, WANG L, ZHANG YG, TU TY, WANG ST, SHEN CH, YUAN HW, ZHONG XZ. A comparison of microbial communities and volatile compounds in wheat Qu from different geographic locations[J]. LWT, 2021, 148: 111752.
- [10] LIU WH, CHAI LJ, WANG HM, LU ZM, ZHANG XJ, XIAO C, WANG ST, SHEN CH, SHI JS, XUZH. Bacteria and filamentous fungi running a relay race in Daqu fermentation enable macromolecular degradation and flavor substance formation[J]. International Journal of Food Microbiology, 2023, 390: 110118.
- [11] MENZEL P, LEE NG K, KROGH A. Fast and sensitive taxonomic classification for metagenomics with Kaiju[J]. Nature Communications, 2016, 7: 11257.
- [12] ZHU WH, LOMSADZE A, BORODOVSKY M. Ab initio gene identification in metagenomic sequences[J]. Nucleic Acids Research, 2010, 38(12): e132.
- [13] YANG Y, WANG ST, LU ZM, ZHANG XJ, CHAI LJ, SHEN CH, SHI JS, XU ZH. Metagenomics unveils microbial roles involved in metabolic network of flavor development in medium-temperature Daqu starter[J]. Food Research International, 2021, 140: 110037.
- [14] 郭静波, 陈微, 姜丽杰, 马放, 郑国臣. 邻苯二甲酸二丁酯生物降解研究进展[J]. 应用与环境生物学报, 2014, 20(6): 1104-1110.
- GUO JB, CHEN W, JIANG LJ, MA F, ZHENG GC. Research progresses in dibutyl phthalate biodegradation[J]. Chinese Journal of Applied and Environmental Biology, 2014, 20(6): 1104-1110 (in Chinese).
- [15] XU YQ, LIU X, ZHAO JR, HUANG HQ, WU MQ, LI XT, LI WW, SUN XT, SUN BG. An efficient phthalate ester-degrading *Bacillus subtilis*: degradation kinetics, metabolic pathway, and catalytic mechanism of the key enzyme[J]. Environmental Pollution, 2021, 273: 116461.
- [16] HE GQ, DONG Y, HUANG J, WANG XJ, ZHANG SY, WU CD, JIN Y, ZHOU RQ. Alteration of microbial community for improving flavor character of Daqu by inoculation with *Bacillus velezensis* and *Bacillus subtilis*[J]. LWT, 2019, 111: 1-8.
- [17] XIAO C, LU ZM, ZHANG XJ, WANG ST, AO L, SHEN CH, SHI JS, XU ZH. Bio-heat is a key environmental driver shaping the microbial community of medium-temperature Daqu[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2017, 83(23): e01550-17.
- [18] 刘永鑫, 秦媛, 郭晓璇, 白洋. 微生物组数据分析方法与应用[J]. 遗传, 2019, 41(9): 845-862.
- LIU YX, QIN Y, GUO XX, BAI Y. Methods and applications for microbiome data analysis[J]. Hereditas (Beijing), 2019, 41(9): 845-862 (in Chinese).
- [19] ZHOU JY, SONG W, TU QC. To assemble or not to assemble: metagenomic profiling of microbially mediated biogeochemical pathways in complex communities[J]. Briefings in Bioinformatics, 2023, 24(1): bbac594.
- [20] WU Q, ZHU Y, FANG C, WIJFFELS RH, XU Y. Can we control microbiota in spontaneous food

- fermentation?-Chinese liquor as a case example[J]. Trends in Food Science & Technology, 2021, 110: 321-331.
- [21] YI ZL, FANG Y, HE KZ, LIU DY, LUO HB, ZHAO D, HE H, JIN YL, ZHAO H. Directly mining a fungal thermostable α -amylase from Chinese Nong-flavor liquor starter[J]. Microbial Cell Factories, 2018, 17(1): 1-14.
- [22] LI WW, FAN GS, FU ZL, WANG WH, XU YQ, TENG C, ZHANG CN, YANG R, SUN BG, LI XT. Effects of fortification of Daqu with various yeasts on microbial community structure and flavor metabolism[J]. Food Research International, 2020, 129: 108837.
- [23] 严伟, 高豪, 蒋羽佳, 钱秀娟, 周杰, 董维亮, 章文明, 信丰学, 姜岷. 2-苯乙醇生物合成的研究进展[J]. 合成生物学, 2021, 2(6): 1030-1045.
- YAN W, GAO H, JIANG YJ, QIAN XJ, ZHOU J, DONG WL, ZHANG WM, XIN FX, JIANG M. Research progress in 2-phenylethanol production through biological processes[J]. Synthetic Biology Journal, 2021, 2(6): 1030-1045 (in Chinese).
- [24] 杜闪, 王雪花, 杨政茂, 刘笑生, 宋焕禄, 王凤寰, 王肇悦. 生物转化合成 β -苯乙醇代谢途径及其调控的研究[J]. 食品与发酵工业, 2014, 40(1): 168-173.
- DU S, WANG XH, YANG ZM, LIU XS, SONG HL, WANG FH, WANG ZY. Study on metabolic pathways of β -phenyl ethanol bioconversion and regulation[J]. Food and Fermentation Industries, 2014, 40(1): 168-173 (in Chinese).
- [25] 朱灵桓, 徐沙, 李由然, 张梁, 石贵阳. 微生物法从头合成 2-苯乙醇的研究进展[J]. 食品与发酵工业, 2021, 47(16): 271-277.
- ZHU LH, XU S, LI YR, ZHANG L, SHI GY. Recent advances on *de novo* biosynthesis of 2-phenylethanol[J]. Food and Fermentation Industries, 2021, 47(16): 271-277 (in Chinese).
- [26] DICKINSON JR, SALGADO LEJ, HEWLINS MJE. The catabolism of amino acids to long chain and complex alcohols in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Journal of Biological Chemistry, 2003, 278(10): 8028-8034.
- [27] YU H, ZHANG RY, YANG FW, XIE YF, GUO YH, YAO WR, ZHOU WB. Control strategies of pyrazines generation from Maillard reaction[J]. Trends in Food Science & Technology, 2021, 112: 795-807.
- [28] 李联正. α -乙酰乳酸脱羧酶基因的克隆表达[D]. 杨凌: 西北农林科技大学硕士学位论文, 2005.
- LI LZ. Cloning and expression of α -acetolactate decarboxylase[D]. Yangling: Master's Thesis of Northwest A&F University, 2005 (in Chinese).
- [29] XIAO ZJ, LU JR. Strategies for enhancing fermentative production of acetoin: a review[J]. Biotechnology Advances, 2014, 32(2): 492-503.

(本文责编 郝丽芳)