

临沂和周口地区中高温大曲细菌群落结构与基因功能差异性研究

马梦月, 郭 壮, 李学思, 管桂坤, 刘 宇, 李富强, 王玉荣

Research on the Differences in Bacteria Community Structure and Gene Function of Medium-High Temperature Daqu in Linyi and Zhoukou Areas

MA Mengyue, GUO Zhuang, LI Xuesi, GUAN Guikun, LIU Yu, LI Fuqiang, and WANG Yurong

在线阅读 View online: <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2023030055>

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

基于16S rDNA高通量测序分析水牛初乳与常乳中细菌多样性

Analysis of Bacterial Diversity in Colostrum and Normal Milk of Buffalo Based on 16S rDNA High-throughput Sequencing

食品工业科技. 2021, 42(13): 125-132 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2020060273>

基于传统培养和高通量测序方法分析羊肉加工过程中的菌群多样性

Analysis of Microbial Diversity in Mutton Processing Based on Traditional Culture and High-Throughput Sequencing

食品工业科技. 2020, 41(9): 95-101,107 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2020.09.015>

高通量测序分析不同采集保存温度下甘南牧区牦牛酸奶真菌多样性

Analysis of Fungal Diversity of Yak Yogurt Collected and Preserved at Different Temperatures in Gannan Pastoral Area Based on High-throughput Sequencing

食品工业科技. 2021, 42(13): 163-169 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2020110233>

梅干菜和腌制雪菜细菌菌群多样性分析

Analysis of Bacterial Diversity of the Pickled and Dried Mustard and the Fermented Potherb Mustard

食品工业科技. 2021, 42(18): 134-141 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2021010065>

基于高通量测序分析四川辣椒酱自然发酵过程中细菌群落结构演替规律

Succession of Bacterial Community Structure during Sichuan Chili Sauce Natural Fermentation Analyzed by High-throughput Sequencing

食品工业科技. 2020, 41(24): 81-86 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2020020262>

Illumina Miseq高通量测序方法对袋装番茄酱微生物多样性分析

Analysis of Microbial Diversity in the Bagged Tomato Sauce by Illumina Miseq High Throughput Sequencing

食品工业科技. 2021, 42(18): 119-125 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2020120254>



关注微信公众号，获得更多资讯信息

马梦月, 郭壮, 李学思, 等. 临沂和周口地区中高温大曲细菌群落结构与基因功能差异性研究 [J]. 食品工业科技, 2024, 45(1): 155–161. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2023030055

MA Mengyue, GUO Zhuang, LI Xuesi, et al. Research on the Differences in Bacteria Community Structure and Gene Function of Medium-High Temperature Daqu in Linyi and Zhoukou Areas[J]. Science and Technology of Food Industry, 2024, 45(1): 155–161. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2023030055

· 生物工程 ·

临沂和周口地区中高温大曲细菌群落结构与基因功能差异性研究

马梦月¹, 郭 壮¹, 李学思², 管桂坤³, 刘 宇³, 李富强⁴, 王玉荣^{1,*}
(1.湖北文理学院湖北省食品配料工程技术研究中心, 湖北襄阳 441053;
2.河南牧业经济学院食品与生物工程学院, 河南郑州 450046;
3.山东兰陵美酒股份有限公司, 山东兰陵 277731;
4.河南省宋河酒业股份有限公司, 河南周口 477262)

摘 要:为明确山东临沂和河南周口地区中高温大曲细菌群落结构及菌群基因功能的差异, 本研究采用 MiSeq 高通量测序技术对 2 个地区中高温大曲的细菌群落结构进行了解析, 并基于直系同源蛋白数据库 (clusters of orthologous groups of proteins, COG) 分析了其细菌类群潜在的功能。 α 多样性发现, 两者在丰富度和多样性上差异均不显著 ($P>0.05$)。相较于周口地区大曲, 在门水平上, 临沂地区大曲中放线菌门 (Actinobacteria) 和拟杆菌门 (Bacteroidetes) 平均相对丰度均显著偏低 ($P<0.05$), 在属水平上, 不动杆菌属 (*Acinetobacter*) 平均相对丰度显著偏高 ($P<0.05$), 地杆菌属 (*Geobacter*) 和泛菌属 (*Pantoea*) 平均相对丰度均显著偏低 ($P<0.05$)。LEfSe (linear discriminant analysis effect size) 分析发现, *Geobacter* 为周口地区大曲中的生物标志物, 而临沂地区大曲中的生物标志物未在属水平体现; β 多样性发现, 两者在整体上存在明显差异; PICRUST (phylogenetic investigation of communities by reconstruction of unobserved states) 分析发现, 临沂地区中高温大曲在转录、氨基酸和核苷转运与代谢功能上显著高于周口地区大曲 ($P<0.05$)。由此可见, 2 个地区中高温大曲的细菌群落结构及菌群基因功能表达均存在明显差异。

关键词:地域, 中高温大曲, 细菌多样性, 高通量测序, 基因功能

中图分类号: TS201.3

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2024)01-0155-07

DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2023030055

本文网刊:



Research on the Differences in Bacteria Community Structure and Gene Function of Medium-High Temperature Daqu in Linyi and Zhoukou Areas

MA Mengyue¹, GUO Zhuang¹, LI Xuesi², GUAN Guikun³, LIU Yu³, LI Fuqiang⁴, WANG Yurong^{1,*}

(1.Hubei Provincial Engineering and Technology Research Center for Food Ingredients, Hubei University of Arts and Science, Xiangyang 441053, China;

2.College of Food and Biological Engineering, Henan University of Animal Husbandry and Economy, Zhengzhou 450046, China;

3.Shandong Lanling Meijiu Co., Ltd., Lanling 277731, China;

4.Henan Songhe Wine Co., Ltd., Zhoukou 477262, China)

Abstract: In order to clarify the differences in the community structure and gene function of medium-high temperature

收稿日期: 2023-03-06

基金项目: 湖北文理学院教师科研能力培育基金“科技创新团队”(2020kpytd009)。

作者简介: 马梦月 (2003-), 女, 本科, 研究方向: 食品生物技术, E-mail: 3510449590@qq.com。

* 通信作者: 王玉荣 (1993-), 女, 博士, 讲师, 研究方向: 食品生物技术, E-mail: wangyurong1993@163.com。

Daqu bacteria in Linyi, Shandong Province and Zhoukou, Henan Province. MiSeq high-throughput sequencing technology was used to analyze the bacterial community structure of medium-high temperature Daqu in the two regions, and the potential functions of bacterial taxa were analyzed based on the clusters of orthologous groups of proteins (COG). The result of α diversity showed that there were no significant differences in richness and diversity ($P>0.05$). Compared with Daqu in Zhoukou area, at the phylum level, the average relative abundance of Actinobacteria and Bacteroidetes in Daqu in Linyi area were significantly lower ($P<0.05$). At the genus level, the average relative abundance of *Acinetobacter* was significantly higher ($P<0.05$), and the average relative abundance of *Geobacter* and *Pantoea* were significantly lower ($P<0.05$). The result of linear discriminant analysis effect size (LEfSe) showed that *Geobacter* was a biomarker in Zhoukou area Daqu, while the biomarker in Linyi area Daqu was not reflected at the genus level. The result of β diversity showed that there were obvious differences as a whole. The result showed that Daqu in Linyi area was significantly higher than Daqu in Zhoukou area in transcription, amino acid and nucleoside transport and metabolic functions by phylogenetic investigation of communities by reconstruction of unobserved states (PICRUSt) ($P<0.05$). Thus, there are obvious differences in bacterial community structure and gene function expression in the two regions.

Key words: region; medium-high temperature Daqu; bacterial diversity; high-throughput sequencing; gene function

作为中国市场占有率最高的白酒,浓香型白酒因其独特的酿造工艺和绵柔醇厚的口感受到了广大消费者的喜爱^[1-2]。浓香型白酒在酿造过程中使用大曲多为中温大曲或中高温大曲,其中,中高温大曲以软质小麦为原料,蕴含了丰富的微生物群和酶类,为白酒的发酵生香提供了动力^[3]。王清龙等^[4]采用 MiSeq 高通量测序技术对河南南部、东部、西部和中部地区浓香型白酒大曲微生物群落结构进行了差异研究,发现南部和西部大曲的细菌属以芽孢杆菌属(*Bacillus*)为主,东部和中部大曲的细菌属以青枯菌属(*Ralstonia*)和乳杆菌属(*Lactobacillus*)为主;MA 等^[5]采用 MiSeq 高通量测序技术对山东潍坊、江苏宿迁和四川绵阳地区浓香型大曲微生物群落结构进行了差异研究,发现山东潍坊大曲中细菌属以魏斯氏菌属(*Weissella*)和未分类的欧文菌科(unclassified Erwiniaceae)为主,江苏宿迁大曲中细菌属以糖多孢菌属(*Saccharopolyspora*)、*Bacillus* 和 *Weissella* 为主,四川绵阳大曲细菌属以变形杆菌属(*Proteus*)、*Lactobacillus* 和 *Weissella* 为主;吴树坤等^[6]采用 MiSeq 高通量测序技术对四川宜宾、泸州和遂宁地区浓香型大曲的微生物群落结构进行了差异研究,发现宜宾和泸州大曲中细菌属以 *Weissella* 和高温放线菌属(*Thermooactinomyces*)为主,遂宁大曲中细菌属以 *Bacillus* 和 *Staphylococcus* 为主。由此可见,地域环境的不同会对大曲所含微生物的类群造成一定的影响。同处于黄淮流域超级产区的山东临沂和河南周口地区,孕育了兰陵和宋河等多数知名浓香型白酒。其中临沂市位于山东省东南部,地近黄海,该地区以沂、沭河为中心,西、北、东三面群山环抱,光照充足,雨量充沛,属温带季风气候^[7]。周口市位于豫东平原,河南省东南部,该地区拥有沙颍河、涡河、西肥河和洪汝河四大水系,降水分布不均,日照、气温变幅大,属暖温带半湿润季风型气候^[8]。由此可见,两地气候存在明显差异,且两地相差 500 公里左右,其环境亦存在一定差异。因此,对临沂和周口地区的中高温大曲细菌类群进行比较分析,不仅可以加深研究人员对

2 个地区中高温大曲中微生物资源进行全面了解,亦可以进一步论证地域环境的因素是否会对大曲细菌类群结构产生影响。

近年来,随着第二代高通量测序技术的迅速发展,众多学者不断地利用该项技术来解析酒醅^[9]、酒曲^[10]和窖泥^[11]的微生物多样性,同时该方法也被广泛应用于解析不同香型白酒酿造过程中酒醅微生物群落结构的动态变化趋势。与传统的微生物培养方法相比,第二代测序技术具有无需培养、高通量、检测速度快和结果准确等优点,此外,该技术还能准确识别难以培养、丰度较低的微生物,全面和客观地揭示微生态系统中微生物群落结构^[12],为探索白酒大曲中微生物的多样性和功能提供了新的工具。

本研究采用 Illumina MiSeq 高通量测序技术对临沂和周口地区共 28 份中高温大曲细菌群落结构进行比较分析,同时基于直系同源蛋白数据库对 2 个地区中高温大曲细菌潜在的功能差异进行解析,以期对黄淮流域超级产区酿酒微生物资源的挖掘提供数据支撑和理论指导。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

中高温大曲 分别采集自山东省临沂市兰陵县(E117°41'~118°18', N34°37'~35°06')和河南省周口市鹿邑县(E115°02'~115°37', N33°43'~34°05'),样品随机选取,及时粉碎后备用。其中,临沂地区大曲样品采集 13 份,周口地区大曲样品采集 15 份。中高温大曲制作步骤基本如下:选取麦粒完整、饱满和无农药污染的小麦为生产原料,加入深井水对其进行润料再辊磨粉碎,粉碎后二次加入深井水进行拌料,拌料均匀后输送到压曲机制作曲坯,待曲坯成型后立即入房排列进行卧曲,再发酵培养 28~30 d,曲坯培养至曲心水分基本全部蒸发,品温降至接近室温时,曲已培养成熟,即可将曲块出房入库,贮存 3~6 个月。

QIAGEN DNeasy mericon Food Kit DNA 基因组提取试剂盒 德国 QIAGEN 公司;5×TransStart™ FastPfu Buffer、dNTPs Mix、FastPfu Fly DNA Pol-

ymerase 北京全式金生物技术有限公司;引物 338F/806R(正向引物序列 338F: 5'-ACTCCTACGGGAG GCAGCA-3';反向引物序列 806R: 5'-GGACTACHV GGGTWTCTAAT-3') 上海桑尼生物科技有限公司; MiSeq 高通量测序配套试剂 美国 Illumina 公司。

Veriti FAST PCR 仪 美国 ABI 公司; DYY-12 电泳仪 北京六一仪器厂; UVPCDS8000 凝胶成像分析系统 美国 ProteinSimple 公司; ND-2000C 微量紫外分光光度计 美国 Nano Drop 公司; PE300 MiSeq 高通量测序平台 美国 Illumina 公司; R930 机架式服务器 美国 DELL 公司。

1.2 实验方法

1.2.1 宏基因组 DNA 提取、PCR 扩增和高通量测序

按照试剂盒的操作步骤对中高温大曲中细菌的基因组 DNA 进行提取, 并以其为模板, 使用已添加核苷酸标签(barcode)的引物 338F/806R 对总 DNA 的 16S rRNA $V_3\sim V_4$ 区域进行扩增, 扩增体系与方法参照 GUO 等^[13]的进行, 之后将检测合格的 PCR 产物寄至上海美吉生物医药科技有限公司完成 2×300 bp 的双末端测序。

1.2.2 生物信息学分析

本研究利用 QIIME(v1.9.1) 平台进行生物信息学分析。首先遵循重叠区的碱基数 ≥ 10 bp、重叠区错配率 ≤ 0.2 、barcode 碱基错配或有效序列长度 ≥ 50 bp 的原则对测序返回的双端序列进行拼接和高质量序列筛选^[14], 使用 PyNAST 进行校准并排齐序列^[15], 按照 100% 和 97% 相似度进行序列划分构建分类操作单元(operational taxonomic units, OTU)^[16], 使用 ChimeraSlayer 去除含有嵌合体的 OTU^[17], 最后选取代表性序列在 RDP^[18]、Greengenes^[19] 和 SILVA^[20] 数据库中进行同源性比对并确定其分类学地位; 计算各样品中细菌类群的超 1、发现物种数、香农和辛普森等 α 多样性指数; 基于加权和非加权 UniFrac 距离进行主坐标分析 2 个地区大曲细菌类群的 β 多样性; 采用 PICRUST (phylogenetic investigation of communities by reconstruction of unobserved states) 软件对大曲中细菌基因功能进行预测^[21]。

1.3 数据处理

使用两独立样本的非参数(Mann-Whitney)检验和多元方差分析(multivariate analysis of variance, MANOVA)解析 2 个地区细菌类群的差异。使用 R 软件(v4.1.3)绘制箱型图和 PCoA 散点图; 使用在线网站 (<http://jvenn.toulouse.inra.fr/app/example.html>) 绘制 Venn 图; 使用 Origin 2017 软件绘制堆积柱状图; 使用在线网站 (<http://huttenhower.sph.harvard.edu/galaxy/>) 绘制 LEfSe 图; 使用 STAMP 软件绘制菌群功能差异图。

2 结果与分析

2.1 两个地区中高温大曲 α 多样性比较分析

基于高通量测序技术, 28 份中高温大曲共获得

1477414 条高质量 16S rRNA 基因序列, 每份样品平均 52764 条, 采用 100% 和 97% 相似度进行序列划分共得到 9330 个 OTU。超 1 指数、发现物种数和香农指数、辛普森指数反映了微生物物种的丰富度和多样性, 指数越高代表物种的丰富度和多样性越高^[22]。本研究首先对 2 个地区中高温大曲的 α 多样性进行了比较分析, 结果如图 1 所示。

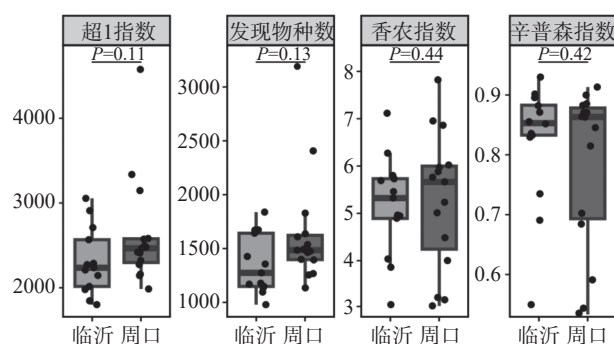


图 1 两个地区中高温大曲 α 多样性比较分析

Fig.1 Comparative analysis of α diversity in medium-high temperature Daqu in two regions

注: 超 1 指数、发现物种数、香农指数和辛普森指数均在测序深度为 28010 条序列时进行计算。

由图 1 可知, 2 个地区中高温大曲的平均超 1 指数分别为 2310 和 2625, 平均发现物种数分别为 1353 和 1611, 平均香农指数分别为 5.35 和 5.68, 平均辛普森指数分别为 0.85 和 0.86, 经 Mann-Whitney 检验分析发现, 2 个地区大曲菌群在 4 个 α 多样性指数上差异均不显著($P>0.05$)。

2.2 两个地区中高温大曲细菌群落结构分析

经序列比对发现, 2 个地区中高温大曲共鉴定到 40 个门和 904 个属, 其中, 临沂地区大曲鉴定到 22 个门和 522 个属, 周口地区大曲鉴定到 39 个门和 797 个属。本研究将平均相对丰度 $>1.0\%$ 的细菌门和属定义为优势细菌门和属。基于门和属水平 2 个地区中高温大曲细菌群落结构组成如图 2 所示。

由图 2a 可知, 2 个地区中高温大曲中优势细菌门有 4 个, 分别为硬壁菌门(Firmicutes)、变形菌门(Proteobacteria)、放线菌门(Actinobacteria)和拟杆菌门(Bacteroidetes)。在临沂和周口地区大曲中, Actinobacteria 的平均相对丰度分别为 1.05% 和 4.38%, Bacteroidetes 分别为 0.81% 和 2.86%, 经 Mann-Whitney 检验分析发现两者差异显著($P<0.05$)。

由图 2b 可知, 2 个地区中高温大曲中平均相对含量大于 1.0% 的属有 6 个, 分别为芽孢杆菌属(Bacillus)、高温放线菌属(Thermoactinomyces)、不动杆菌属(Acinetobacter)、克罗彭斯特德菌属(Kroppenstedtia)、地杆菌属(Geobacter)和泛菌属(Pantoea)。在临沂和周口地区大曲中, Acinetobacter 的平均相对丰度分别为 8.08% 和 4.28%, Geobacter 分别为 0.002% 和 3.44%, Pantoea 分别为 0.43% 和 1.83%, 经 Mann-Whitney 检验分析发现差异均显著

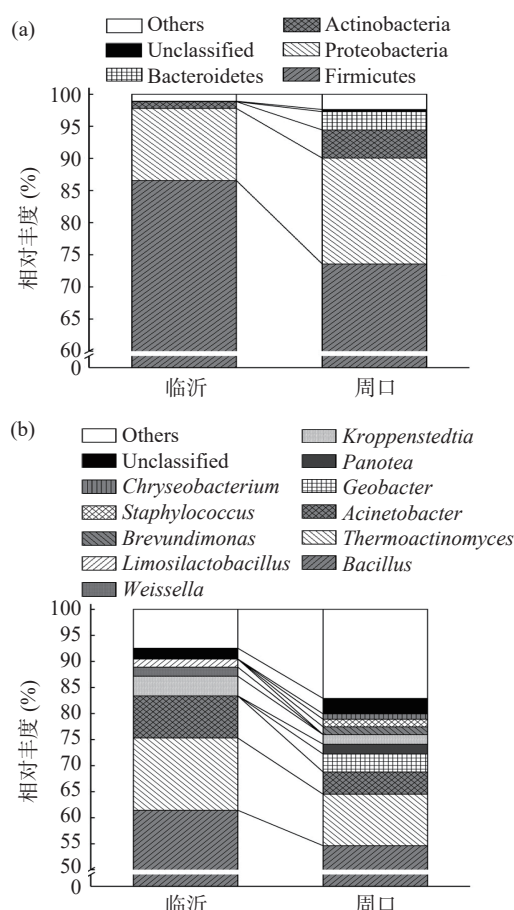


图2 基于门(a)和属(b)水平的两个地区中高温大曲中细菌群落组成分析

Fig.2 Analysis of bacterial community composition in medium-high temperature Daqu in two regions based on phylum (a) and genus (b) levels

($P < 0.05$)。此外,魏斯氏菌属(*Weissella*)和黏液乳杆菌属(*Limosilactobacillus*)在周口地区大曲中的平均相对丰度仅为 0.34% 和 0.04%, 而其作为优势细菌属在临沂地区大曲中平均相对丰度分别为 1.74% 和 1.55%。有研究报道,在大曲发酵过程中 *Weissella* 和 *Limosilactobacillus* 等乳酸菌的代谢活动为发酵提供了酸性环境,有助于微生物群落的有效自我驯化,其中 *Weissella* 还参与了 2,3-丁二醇的代谢,促进了大曲风味物质的积累^[23],除此之外,乳酸菌是大曲

中的优势细菌^[24],在白酒发酵过程中具有促进美拉德反应和保持酿酒微生态环境等作用^[25],是白酒风味物质演替的推动者之一。短波单胞菌属(*Brevundimonas*)、葡萄球菌属(*Staphylococcus*)和金黄杆菌属(*Chryseobacterium*)虽为周口地区大曲中的优势细菌属,平均相对丰度分别为 1.50%、1.44% 和 1.07%,但其在临沂地区大曲中的平均相对丰度仅为 0.26%、0.18% 和 0.25%。ZHANG 等^[26]发现 *Staphylococcus* 参与了 2,3-丁二醇的代谢,且其代谢产生的水解长链脂肪酸和甘油的脂肪酶可生成游离脂肪酸和甘油,因而构成了白酒中香味物质本身或前体物质;姚亚林等^[27]发现 *Brevundimonas* 具有较强水解淀粉和蛋白质的能力,在中温和高温大曲中与水分和淀粉的生成呈现正相关。亦有研究指出, *Thermoactinomyces*、*Pantoea*、*Staphylococcus* 和 *Chryseobacterium* 在大曲开始发酵阶段只存在于空气中,之后随着发酵温度的降低才逐渐进入大曲中得到积累^[28]。由此可见,2 个地区大曲细菌类群在属水平上存在明显差异,且在后续研究中积极探索周围环境因素对大曲发酵过程中细菌群落的累积与代谢是极为必要的。

本研究进一步通过 LefSe 对 2 个地区中高温大曲中的生物标志物进行了甄别,结果如图 3 所示。图中柱长显示了线性判别值,值越大其富集程度越高^[29]。

由图 3 可知,在 LDA 阈值得分为 4.0 时,2 个地区中高温大曲中共有 9 个细菌类群存在显著差异($P < 0.05$),其中各有 2 个、3 个、1 个、2 个和 1 个分别体现在门、纲、目、科和属水平上。在属水平, *Geobacter* 在周口地区大曲中富集,由此可见, *Geobacter* 可作为周口地区大曲中的生物标志物;在属水平,没有细菌类群在临沂地区大曲中富集,因而临沂地区大曲中的生物标志物在属水平未能体现。

2.3 两个地区中高温大曲菌群分布及 β 多样性分析

通过上述分析发现,2 个地区中高温大曲细菌类群在门属构成上存在一定的差异,因而为进一步直观地展现其群落结构异同,本研究在 OTU 水平上绘制了 Venn 图并基于 UniFrac 距离进行了主坐标分析,结果如图 4 所示。

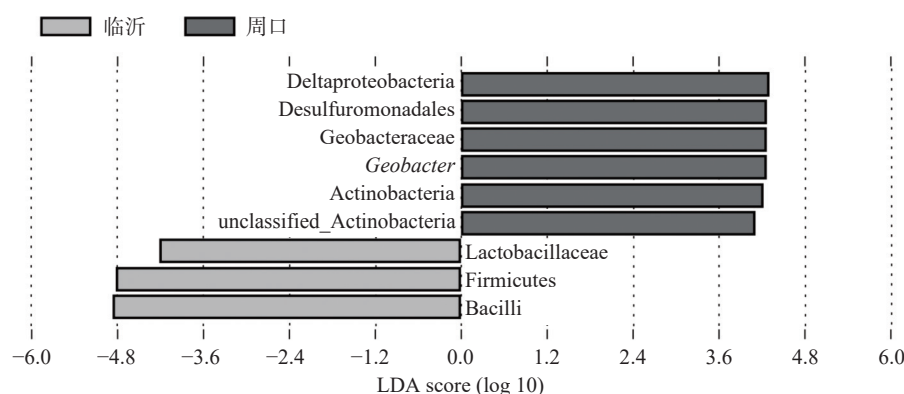


图3 LDA 线性判别分析图

Fig.3 LDA linear discriminant analysis diagram

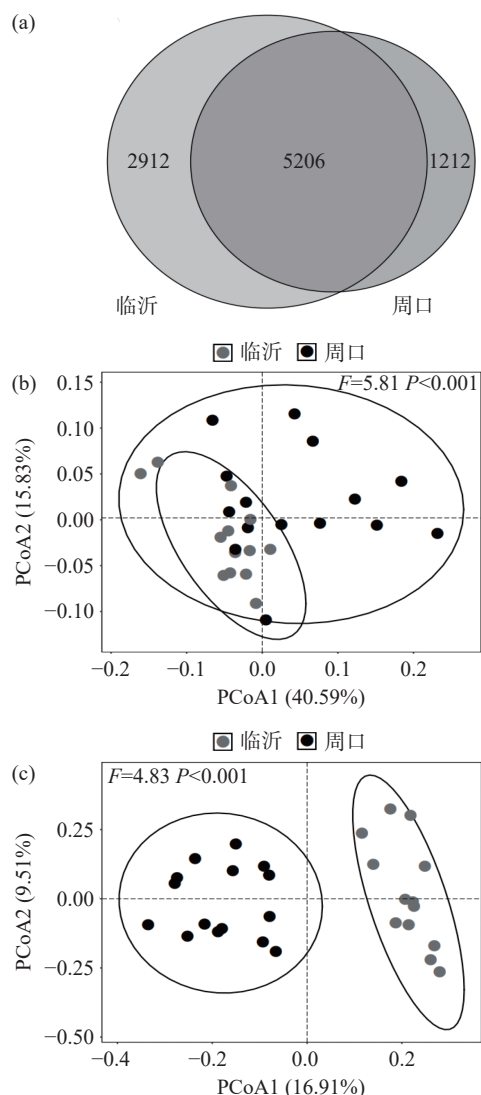


图 4 两个地区中高温大曲中细菌类群 OTU 分布(a)及基于加权(b)和非加权(c)UniFrac 距离的 PCoA 分析

Fig.4 OTU distribution of bacterial taxa (a) and PCoA analysis based on weighted (b) and unweighted (c) UniFrac distance in medium-high temperature Daqu in two regions

注: F 值表示方差, $P<0.001$ 表示差异极显著, 圆圈表示置信区间。

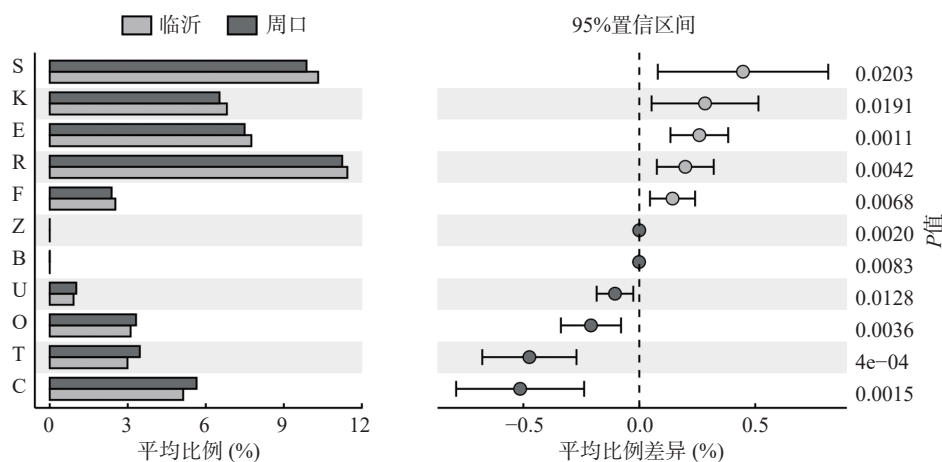


图 5 两个地区中高温大曲菌群功能差异分析

Fig.5 Analysis of microflora functional differences in medium-high temperature Daqu in two regions

注: 图中左侧字母代表的基因功能如下, B-染色质结构与动力学; C-能量生产和转换; E-氨基酸转运与代谢; F-核苷转运与代谢; K-转录; O-翻译后修饰, 蛋白质周转, 伴侣蛋白; R-一般功能预测; S-未知功能; T-信号转导机制; U-细胞内运输, 分泌和囊泡运输; Z-细胞骨架。

由图 4a 可知, 本研究共划分了 9330 个细菌 OTU, 其中 2912 个 OTU 为临沂特有, 1212 个 OTU 为周口特有, 5206 个 OTU 为 2 个地区共有。由此可见, 2 个地区大曲既具有各自独特的细菌类群, 同时还含有共有的细菌群落。由图 4b 可知, 在考虑各 OTU 序列相对丰度的情况下进行主坐标分析时, 第一主成分和第二主成分的总贡献值为 56.42%, 2 个地区样品间虽存在明显的重叠现象, 但亦具有一定的分离趋势, 经多元方差分析其方差值为 5.81, 结果可信度大于 99.99%; 由图 4c 可知, 在仅考虑 OTU 中是否含有序列的情况下进行主坐标分析时, 临沂地区大曲位于 X 轴的正方向, 周口地区大曲位于 X 轴负方向, 2 个地区样品间存在明显的分离趋势, 经多元方差分析其方差值为 4.83, 结果可信度大于 99.99%。由此可见, 2 个地区中高温大曲中细菌类群在整体上存在明显差异。

2.4 两个地区中高温大曲发酵菌群功能差异分析

在比较了 2 个地区中高温大曲细菌菌群结构的差异后, 本研究对其菌群的基因功能亦进行了差异分析, 将序列上传至 PICRUSt 软件进行比对后得到具有差异的功能类群如图 5 所示。

由图 5 可知, 相较于周口地区大曲, 临沂地区大曲菌群基因功能在未知功能、转录功能、氨基酸转运与代谢功能、一般功能预测和核苷酸转运与代谢功能上的表达均显著偏高 ($P<0.05$), 在细胞内运输功能、翻译后修饰, 蛋白质周转, 伴侣功能、信号转导机制功能和能量生产和转换功能上的表达均显著偏低 ($P<0.05$)。焦晶凯^[30]的研究发现, 乳酸菌的蛋白水解系统可为其生长提供所需氨基酸, 结合大曲中细菌属的分析结果来看, *Weissella* 和 *Limosilactobacillus* 在临沂地区大曲中平均相对丰度均 $>1.0\%$, 而其在周口地区大曲中平均相对丰度均不足 0.4% , 这可能是造成临沂地区大曲中细菌氨基酸转运与代谢功能较

强的原因。由此可见,2个地区中高温大曲的细菌菌群基因功能亦存在明显差异。

3 结论

本研究通过 MiSeq 高通量测序技术对黄淮流域超级产区临沂和周口地区中高温大曲细菌群落结构和菌群基因功能进行了比较分析,结果发现,相较于周口地区大曲,临沂地区大曲中 *Weissella* 和 *Limosilactobacillus* 平均相对丰度明显偏高,*Brevundimonas*、*Staphylococcus* 和 *Chryseobacterium* 平均相对丰度明显偏低,且其在转录、氨基酸和核苷转运与代谢功能表达上明显偏高;*Geobacter* 为周口地区大曲中的生物标志物,而临沂地区大曲中的生物标志物在属水平未能体现。由此可见,临沂和周口地区中高温大曲的细菌类群结构和菌群基因功能均存在明显差异,并进一步证实了地域因素会对大曲细菌类群结构产生影响。

参考文献

- [1] LIU Y, QIAO Z, ZHAO Z, et al. Comprehensive evaluation of Luzhou-flavor liquor quality based on fuzzy mathematics and principal component analysis[J]. Food Science & Nutrition, 2022, 10(6): 1780–1788.
- [2] YAN S, WANG S, WEI G, et al. Investigation of the main parameters during the fermentation of Chinese Luzhou-flavour liquor[J]. Journal of the Institute of Brewing, 2015, 121(1): 145–154.
- [3] 万自然. 大曲培养过程中微生物及酶的变化[J]. 酿酒科技, 2004, 35(4): 25–26. [WAN Z R. Changes of microbes and enzymes during Daqu culture process[J]. Liquor-Making Science & Technology, 2004, 35(4): 25–26.]
- [4] 王清龙, 李海登, 刘延波, 等. 河南不同地区浓香型白酒大曲理化性质和微生物多样性分析[J]. 中国酿造, 2022, 41(11): 31–38. [WANG Q L, LI D H, LIU Y B, et al. Physicochemical property and microbial diversity of strong-flavor Baijiu Daqu in different regions of Henan[J]. China Brewing, 2022, 41(11): 31–38.]
- [5] MA S, SHANG Z, CHEN J, et al. Differences in structure, volatile metabolites, and functions of microbial communities in Nongxiangxing Daqu from different production areas[J]. LWT, 2022, 166(7): 113784.
- [6] 吴树坤, 谢军, 卫春会, 等. 四川不同地区浓香型大曲微生物群落结构比较[J]. 食品科学, 2019, 40(14): 144–152. [WU S K, XIE J, WEI C H, et al. Comparison of microbial community structure of starter cultures (Daqu) for Luzhou-flavor liquor in different regions of Sichuan[J]. Food Science, 2019, 40(14): 144–152.]
- [7] 卢山. 临沂地区气候舒适度特征分析与评价[J]. 南方农业, 2020, 14(26): 191–192. [LU S. Analysis and evaluation of climate comfort characteristics in Linyi region[J]. South China Agriculture, 2020, 14(26): 191–192.]
- [8] XING H, YONG Y. Analysis on the law of occurrence of shallow geothermal energy in Zhoukou City of Henan Province, China[J]. Journal of Groundwater Science and Engineering, 2019, 7(3): 282–287.
- [9] ZHUANSUN W, XU J, LI Z, et al. Dynamic changes in the microbial community, flavour components in Jiupai of a novel Mao-tai-Luzhou-flavoured liquor under various Daqu blending modes and their correlation analysis[J]. LWT, 2022, 172(12): 114167.
- [10] 向凡舒, 朱媛媛, 邓凤, 等. 建始地区米酒曲细菌和真菌多样性研究[J]. 食品工业科技, 2021, 42(1): 126–131. [XIANG F S, ZHU Y Y, DENG F, et al. Bacterial and fungal diversity of rice wine Koji in Jianshi area[J]. Science and Technology of Food Industry, 2021, 42(1): 126–131.]
- [11] 周文, 舒学香, 张崇军, 等. 宜宾地区不同性状窖泥的细菌群落结构解析及代谢功能预测[J]. 中国酿造, 2022, 41(8): 110–114. [ZHOU W, SHU X X, ZHANG C J, et al. Structure analysis and metabolic function prediction of bacterial community of pit mud with different traits in Yibin[J]. China Brewing, 2022, 41(8): 110–114.]
- [12] WANG Y, CAI W, WANG W, et al. Analysis of microbial diversity and functional differences in different types of high-temperature Daqu[J]. Food Science & Nutrition, 2021, 9(2): 1003–1016.
- [13] GUO Z, WANG Y, XIANG F, et al. Bacterial diversity in pickled cowpea (*Vigna unguiculata* [Linn.] Walp) as determined by Illumina MiSeq sequencing and culture-dependent methods[J]. Current Microbiology, 2021, 78(4): 1286–1297.
- [14] 王玉荣, 杨成聪, 葛东颖, 等. 扩增区域对鲜辣椒细菌 MiSeq 测序的影响[J]. 食品科学, 2019, 40(10): 134–140. [WANG Y R, YANG C C, GE D Y, et al. Influence of different amplified regions on results of bacterial diversity in Zhaguangjiao, a Chinese traditional fermented chili product, by MiSeq sequencing[J]. Food Science, 2019, 40(10): 134–140.]
- [15] CAPORASO J G, BITTINGER K, BUSHMAN F D, et al. PyNAST: A flexible tool for aligning sequences to a template alignment[J]. Bioinformatics, 2010, 26(2): 266–267.
- [16] WEI Z G, ZHANG X D, CAO M, et al. Comparison of methods for picking the operational taxonomic units from amplicon sequences[J]. Frontiers in Microbiology, 2021, 12(3): 644012.
- [17] POLLOCK J, GLENDINNING L, WISEDCHANWET T, et al. The madness of microbiome: Attempting to find consensus “best practice” for 16S microbiome studies[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2018, 84(7): 02627.
- [18] MIODUCHOWSKA M, NITKIEWICZ B, ROSZKOWSKA M, et al. Taxonomic classification of the bacterial endosymbiont *Wolbachia* based on next-generation sequencing: Is there molecular evidence for its presence in tardigrades?[J]. Genome, 2021, 64(10): 951–958.
- [19] BRANDT M I, TROUCHE B, QUINTRIC L, et al. Bioinformatic pipelines combining denoising and clustering tools allow for more comprehensive prokaryotic and eukaryotic metabarcoding[J]. Molecular Ecology Resources, 2021, 21(6): 1904–1921.
- [20] ROBESON M S, O’ROURKE D R, KAEHLER B D, et al. RESCRIPT: reproducible sequence taxonomy reference database management[J]. PLoS Computational Biology, 2021, 17(11): e1009581.
- [21] AGRAWAL S, KINH C T, SCHWARTZ T, et al. Determining uncertainties in PICRUST analysis—an easy approach for autotrophic nitrogen removal[J]. Biochemical Engineering Journal, 2019, 152(12): 107328.
- [22] QIU Z, LI N, LU X, et al. Characterization of microbial community structure and metabolic potential using Illumina MiSeq platform during the black garlic processing[J]. Food Research International, 2018, 106(7): 428–438.
- [23] YANG Y, WANG S T, LU Z M, et al. Metagenomics unveils microbial roles involved in metabolic network of flavor development in medium-temperature daqu starter[J]. Food Research International, 2021, 140(2): 110037.
- [24] ZHANG X, ZHAO J, DU X. Barcoded pyrosequencing analysis of the bacterial community of Daqu for Light-flavour Chinese liquor[J]. Letters in Applied Microbiology, 2014, 58(6): 549–555.

- [25] 梁晨, 杜海, 徐岩. 大曲贮存过程中原核微生物群落结构及风味成分演替规律[J]. *微生物学通报*, 2017, 44(2): 384-393. [LIANG C, DU H, XU Y. The succession of procaryotic microbial community and the flavor components in the storage process of Daqu[J]. *Microbiology China*, 2017, 44(2): 384-393.]
- [26] ZHANG Y, XU J, DING F, et al. Multidimensional profiling indicates the shifts and functionality of wheat-origin microbiota during high-temperature Daqu incubation[J]. *Food Research International*, 2022, 156(6): 111191.
- [27] 姚亚林, 邓杰, 任志强, 等. 不同品温大曲及其曲房空气的细菌群落变化规律和相关性[J]. *现代食品科技*, 2021, 37(3): 62-69. [YAO Y L, DENG J, REN Z Q, et al. Variations and correlation between bacterial communities in Daqu and the workshop air at different temperatures[J]. *Modern Food Science and Technology*, 2021, 37(3): 62-69.]
- [28] 翟磊, 于学健, 冯慧军, 等. 宜宾产区浓香型白酒酿造生境中细菌的群落结构[J]. *食品与发酵工业*, 2020, 46(2): 18-24. [ZHAI L, YU X J, FENG H J, et al. Study on bacteria community structure in the brewing habitats of strong flavour Chinese Baijiu from Yibin region[J]. *Food and Fermentation Industries*, 2020, 46(2): 18-24.]
- [29] 张振东, 王玉荣, 侯强川, 等. 市售茨河花色腐乳和红方腐乳微生物菌群及风味物质的比较分析[J]. *食品与发酵工业*, 2022, 48(13): 70-77. [ZHANG Z D, WANG Y R, HOU Q C, et al. Comparative analysis of microbial community and flavor compounds between Huase and red sufu[J]. *Food and Fermentation Industries*, 2022, 48(13): 70-77.]
- [30] 焦晶凯. 乳酸菌代谢研究进展[J]. *乳业科学与技术*, 2020, 43(2): 49-55. [JIAO J K. Progress in research on lactic acid bacterial metabolish[J]. *Journal of Dairy Science and Technology*, 2020, 43(2): 49-55.]