

城固酒窖泥微生物多样性及糖代谢过程分析

陈国伟¹, 解修超^{*1,2}, 宋玉^{1,2}, 邓百万^{1,2}, 胥彦明³, 田国强³

(1. 陕西理工大学 生物科学与工程学院, 陕西 汉中 723001; 2. 陕西省食药菌工程技术研究中心, 陕西 汉中 723001; 3. 陕西省城固酒业股份有限公司, 陕西 汉中 723000)

摘要: 采用传统培养和高通量测序技术分析城固酒窖泥微生物多样性及糖代谢过程。结果表明:窖泥中细菌可划分为 68 属,核心菌群为 *Petrimonas*、*Bacillus*、*Sedimentibacter*、*Clostridium*;真菌可划分为 149 属,核心菌群为 *Issatchenkia*、*Debaryomyces*、*Pichia*、*Aureobasidium*。KEGG 数据库共注释到 236 022 个 unigene,碳水化合物代谢为主要代谢活动,以丙酮酸代谢为主。CAZy、COG 数据库分别注释了 23 个功能大类和 210 个主要的碳水化合物酶类,其中未知功能的预测蛋白质数量最多,糖苷水解酶和糖基转移酶数量占预测蛋白质序列的 31%、碳水化合物活性酶的 74%。在糖代谢途径中,不同糖类转运蛋白系统共有 3 种,具备磷酸化糖类的关键酶基因,可将其转化为糖酵解中间产物,其中甘露糖转运蛋白系统控制基因最多为 477 个,表明对甘露糖转运能力最强。研究了城固酒窖泥中优势微生物菌群及相关糖代谢通路,为城固酒品质的改善提供了理论依据。

关键词: 城固酒;窖泥;微生物多样性;糖代谢过程

中图分类号:Q 93-331 文章编号:1673-1689(2023)06-0026-12 DOI:10.3969/j.issn. 1673-1689.2023.06.005

Analysis of Microbial Diversity and Sugar Metabolism Process in Pit Mud of Chenggu Baijiu

CHEN Guowei¹, XIE Xiuchao^{*1,2}, SONG Yu^{1,2}, DENG Baiwan^{1,2}, XU Yanming³, TIAN Guoqiang³

(1. School of Biological Science and Engineering, Shaanxi University of Technology, Hanzhong 723001, China; 2. Shaanxi Provincial Engineering Research Center of Edible & Medicinal Fungi, Hanzhong 723001, China; 3. Shaanxi Chenggu Liquor Co. Ltd, Hanzhong 723000, China)

Abstract: In order to explore the microbial diversity and sugar metabolism process in pit mud of Chenggu Baijiu, traditional culture-dependent and high-throughput sequencing technology were used for analysis. The results showed that the bacteria in pit mud could be divided into 68 genera, and the core-microbiome were *Petrimonas*, *Bacillus*, *Septinibacter* and *Clostridium*. The fungi could be divided into 149 genera and the core-microbiome included *Issatchenkia*, *Debaryomyces*, *Pichia* and *Aureobasidium*. A total of 236 022 unigenes were annotated in KEGG database, with carbohydrate metabolism as the main metabolic activity and pyruvate metabolism as the most important process.

收稿日期: 2021-06-18

基金项目: 陕西省重点研发计划项目(2019NY-134);陕西省教育厅 2020 年服务地方专项科学研究计划项目(20JC010)。

* 通信作者: 解修超(1978—),男,博士,副教授,硕士研究生导师,主要从事微生物资源保育及应用开发、微生物发酵及食品微生物技术方面的研究。E-mail:xiexiuchao@126.com

The CAZy and COG databases annotated 23 functional categories and 210 major carbohydrate-active enzymes, respectively, among which the number of predicted proteins with unknown functions was the highest, followed by glycoside hydrolase and glycosyltransferase, accounting for 31% of the predicted protein sequence and 74% of the carbohydrate-active enzymes. In the sugar metabolism pathway, there were three different sugar transport protein systems with the key enzyme genes of phosphorylated sugars which could be converted sugars into intermediate products of glycolysis. Among them, there were 477 genes controlled by mannose transporter system, indicating the strongest ability to transport mannose. This study identified the dominant microbial community and related sugar metabolism pathway in pit mud of Chenggu Baijiu, providing a theoretical basis for improving the quality of Chenggu Baijiu.

Keywords: Chenggu Baijiu, pit mud, microbial diversity, sugar metabolism process

中国白酒历史悠久,风格多变。白酒按香型可分为:浓香型、清香型、酱香型、米香型和兼香型五大香型^[1]。城固位于陕南汉中盆地,浓香型白酒已有3 000多年酿造历史。城固酒素有“城固佳酿味甘美,醉倒东西南北客”之誉^[2]。白酒窖泥中含有多种丰富的微生物,微生物的数量及种类决定了窖泥质量的好坏,直接影响到酒的品质。因此,对窖泥微生物的群落组成、多样性及基因注释等进行分析,并对微生物和环境进行双向研究,有利于白酒酿造过程的稳定和改善。

20世纪60年代,我国才开始对窖泥中的微生物展开研究,目前对窖泥微生物的研究技术主要采用纯培养技术与免培养技术^[3]。传统纯培养技术分析微生物存在一定的局限性,纯培养菌株离开了白酒生产中的真实环境,无法完全反映发酵过程中各微生物之间的联系,不能从整体上研究微生物结构,且绝大多数微生物是未培的^[4-7]。基于微生物总基因组DNA的高通量测序法是免培养技术方法之一,以高通量及低成本为主要特征,并在此基础上保持了第一代测序的高准确性,逐渐成为目前窖泥中微生物研究的重要手段^[8-9]。高通量测序技术能全面反映窖泥中微生物的群落结构,从整体上对微生物进行研究,并可对特定微生物类群进行深入分析。

作者采用传统培养以及高通量测序法,分析城固酒窖泥中的菌群组成和基因功能,为进一步筛选及应用功能菌株来调控改善城固酒的品质提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

1.1.1 材料 窖泥样品:陕西省城固酒业股份有限

公司;细菌基因组DNA提取试剂盒:安诺伦(北京)生物科技有限公司产品;真菌基因组DNA提取试剂盒:安诺伦(北京)生物科技有限公司产品。

1.1.2 试剂 牛肉浸粉、氯化钠、蛋白胨、葡萄糖、硫酸镁、磷酸二氢钾等:均为分析纯。

1.1.3 培养基 孟加拉红培养基、察氏培养基、YPD培养基:北京奥博星生物技术有限责任公司产品;牛肉膏蛋白胨培养基、葡萄糖马铃薯琼脂培养基:作者所在实验室配制。

1.2 仪器设备

LS-B50L高压蒸汽灭菌锅:上海申安医疗器械厂;BSA8201电子分析天平:北京赛多利斯科学仪器有限公司;Alliance 4.7荧光凝胶成像仪:英国UVitec公司;TANON EPS300凝胶电泳仪:上海天能科技有限公司;Vortex Genius 3涡旋混合仪:德国IKA集团;TC-4000热循环PCR扩增仪:英国TECHEN公司;ZWY-2112B恒温培养振荡器:上海智诚分析仪器制造有限公司。

1.3 传统法分析窖泥微生物多样性

1.3.1 窖泥微生物分离纯化 称取10.00 g窖泥样品,倒入90 mL无菌水锥形瓶中,140 r/min、37℃富集培养30 min。利用传统稀释涂布平板法分离窖泥微生物,从分离平板挑取形态不同的单菌落于新的固体培养基上,多次划线纯化,获得纯化菌株。真菌于4℃马铃薯琼脂糖培养基斜面传代保藏,细菌于-20℃体积分数20%的甘油中保藏。

1.3.2 窖泥微生物鉴定 形态学观察:将筛选到的目标菌株在相应的平板上划线,分别于37℃和28℃培养后观察菌落的形态特征。

分子生物学鉴定:细菌采用水煮法提取基因组

DNA,用 27F(5'-AGAGTTTGATCCTGGCCAG-3')和 1492R(5'-GGTTACCTTGTACGACTT-3')通用引物对细菌基因组 DNA 扩增。PCR 反应条件为:94 ℃预变性 5 min,94 ℃变性 30 s,55 ℃退火 30 s,72 ℃延伸 90 s,72 ℃再延伸 10 min,4 ℃保存,共 33 个循环。真菌采用 CTAB 法提取基因组 DNA,用 ITS1 和 ITS4 通用引物对真菌基因组 DNA 扩增,PCR 反应条件为:94 ℃预变性 5 min,94 ℃变性 30 s,58 ℃退火 30 s,72 ℃延伸 90 s,72 ℃再延伸 10 min,4 ℃保存,共 33 个循环。PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳检测合格后送至生工生物工程(上海)股份有限公司测序,结果在 NCBI 的 GenBank 数据库进行 BLAST 序列比对,选择分类信息较为完整且相似度高的序列确定同缘关系。

1.4 高通量测序分析窖泥微生物多样性

1.4.1 样品的预处理 取适量窖泥放入灭菌的 2 mL 离心管中,离心后取沉淀进行提取。

1.4.2 样品总 DNA 提取 采用磁珠法提取 DNA,在裂解液和蛋白酶共同作用下裂解消化,经结合液和磁珠吸附纯净 DNA,用 1 g/dL 琼脂糖凝胶电泳(电压:200 V;时间:30 min)检测 DNA 完整性,无降解,用 Qubit 定量检测 gDNA 质量浓度,确保达到构建二代测序文库要求。

1.4.3 16S rRNA、ITS 的扩增、测序与分析 采用细菌提取试剂盒和真菌提取试剂盒提取 gDNA。细菌引物采用 341F(5'-CCTACGGGNGGCWGCAG)和 805R(5'-GACTACHVGGGTATCTAATCC),真菌引物采用 ITS1F(5'-CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA)和 ITS2(5'-GCTGCGTTCTTCATCGATGC)对靶序列扩增后测序,测序得到的数据进行微生物多样性分析。

1.4.4 宏基因组测序和数据分析 取质量合格的 gDNA 样品,对 DNA 进行片段化处理,先对测序的原始数据通过 FastQC 软件进行质量评估,并通过 Trimmomatic 软件进行过滤处理,得到相对准确的有效数据进行序列拼接,将组装后的序列结果进行 ORF 预测,得到具有潜在功能的基因,然后基于不同的数据库进行物种和功能基因的注释与分类。

2 结果与分析

2.1 窖泥微生物分离鉴定结果

利用传统稀释涂布分离法从窖泥中分离出细

菌 49 株,共 21 属;真菌 21 株,共 14 属,其中包括 3 株酵母菌。图 1 为部分窖泥微生物菌落形态图。

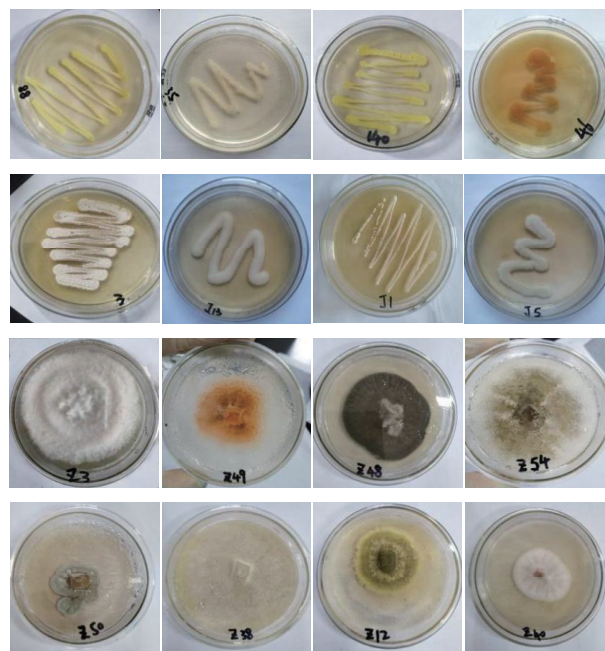


图 1 部分窖泥微生物菌落形态

Fig. 1 Colony morphology of microorganism in some pit mud

细菌菌株经过 16S rRNA 扩增后测序,真菌菌株经过 ITS 基因扩增后测序,测序结果在 NCBI 上 BLAST 比对,并用 MEGA7.0 构建系统发育树,见图 2 和图 3。

通过鉴定和系统发育分析可知,窖泥中细菌可分为 *Bacillus*、*Streptomyces*、*Brevibacterium*、*Clostridium*、*Terrisporobacter*、*Enterobacter* 等。真菌可分为 *Aspergillus*、*Cladosporium*、*Monascus*、*Penicillium*、*Debaryomyces*、*Rhodotorula* 及 *Saccharomyces* 等。

2.2 高通量测序结果统计分析

2.2.1 测序数据质量评估 城固酒窖泥样品基因组包含 44 967 652 条序列,G+C 比例为 51.15 %。由图 4 可以看出,序列读长为 150 bp,图中所测碱基质量整体都在 Q{35}左右,没有太大的质量值波动,表明本次测序结果较好。根据碱基的位置,对每个位置上的 A、T、C、G 的数量进行统计,判断 AT、CG 是否有分离现象和过表达序列。由图 5 可知,因随机引物扩增偏差的原因,会导致前面 10 bp 的碱基出现杂乱的波动,之后所有位点上的每条线平等且接近,呈水平线,表明测序样品未污染。

2.2.2 菌群多样性分析 单样品的多样性分析不

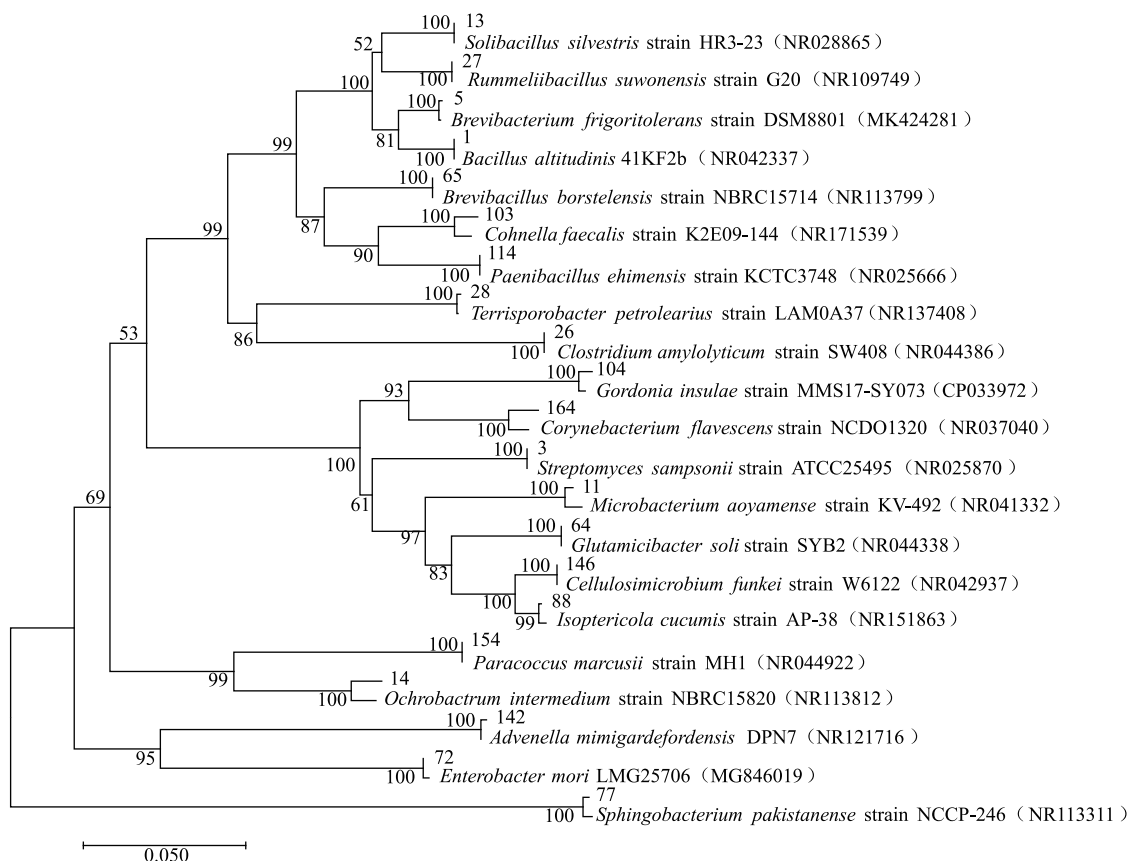


图 2 窖泥细菌系统发育树

Fig. 2 Phylogenetic tree of bacterial in pit mud

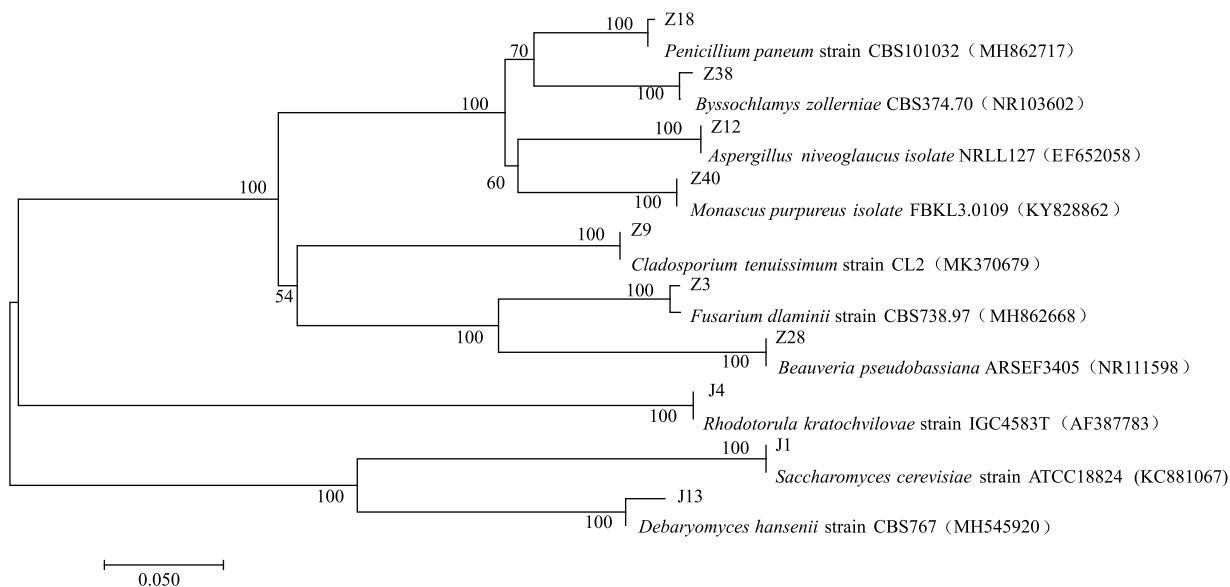


图 3 窖泥真菌系统发育树

Fig. 3 Phylogenetic tree of fungi in pit mud

仅可以反映微生物群落的丰度和多样性,还可通过一系列统计学分析指数估计环境群落的物种丰度和多样性。作者以 Alpha 稀释性曲线和多样性指数

分析样本,研究测序数据量的合理性和单个样品内部物种的丰度及多样性。样本有效序列计算后的 Alpha 稀释性曲线见图 6,多样性指数分析见表 1,

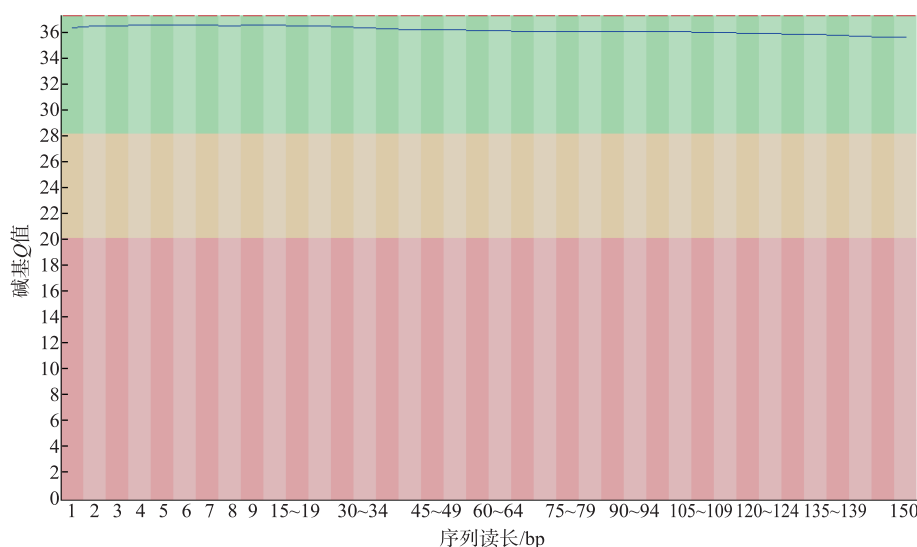


图 4 碱基质量分布图

Fig. 4 Distribution of base quality

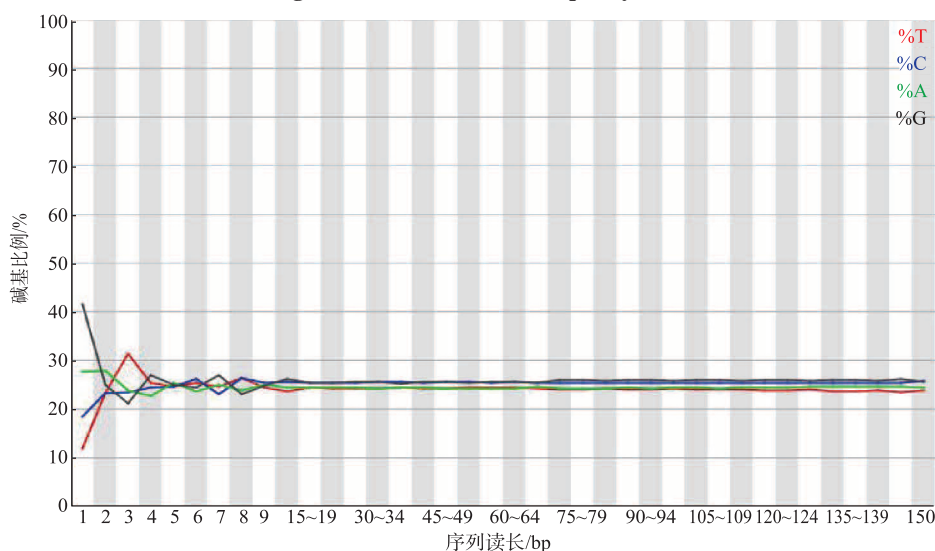


图 5 碱基比例分布图

Fig. 5 Distribution of base content

Shannon 指数见图 7。本试验中稀释性曲线达到平缓,说明本次测序数据量足够大,可以反映样品中绝大多数的微生物物种信息,文库覆盖率反映了测序结果的准确性,能代表样本的真实情况。真菌 Chao1 指数大于细菌 Chao1 指数,说明真菌物种总数大于细菌物种总数。细菌 Simpson 指数远大于真菌 Simpson 指数,说明细菌的群落多样性远高于真菌。

2.2.3 细菌与真菌群落结构分析 城固酒窖泥属水平分类结果见图 8。细菌(A1)在属水平上,测序共划分了 68 个菌属和其他未分类种群,但只有 12 个属相对丰度在 1 % 以上,主要核心菌属为

Petrimonas (相对丰度为 10.54%)、*Bacillus* (相对丰度为 9.21%)、*Sedimentibacter* (相对丰度为 2.37%)、*Clostridium* (相对丰度为 1.21%)。真菌(B2)在属水平上,测序共划分了 149 个菌属和其他未分类种群,但只有 16 个属丰度在 1%以上,主要核心菌属为 *Issatchenkia* (相对丰度为 17.12%)、*Debaryomyces* (相对丰度为 13.83%)、*Pichia* (相对丰度为 8.0%)、*Aureobasidium* (相对丰度为 7.64%)、*Aspergillus* (相对丰度为 4.66%)。

2.2.4 KEGG 功能注释分析 城固酒窖泥中共注释了 236 022 个 unigene。从属于 KEGG 数据库中六大

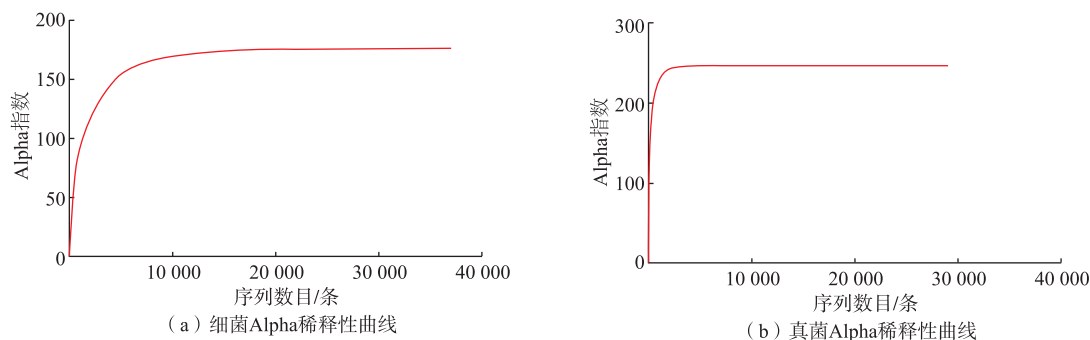


图 6 Alpha 指数稀释性曲线

Fig. 6 Rarefaction curve of alpha index

表 1 Alpha 多样性分析

Table 1 Analysis of alpha diversity

样本	序列数目/条	OTU 数目/条	Shannon 指数	Chao1 指数	Ace 指数	Simpson 指数	覆盖率/%
A1(细菌)	37 144	176	2.467 944	176	176	0.295 368	1
B2(真菌)	109 574	247	3.889 713	247	247	0.064 253	1

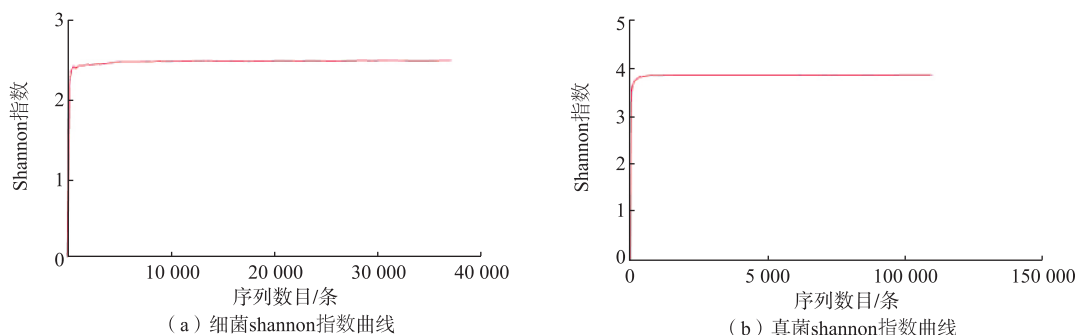


图 7 Shannon 指数稀释性曲线

Fig. 7 Rarefaction curve of Shannon index

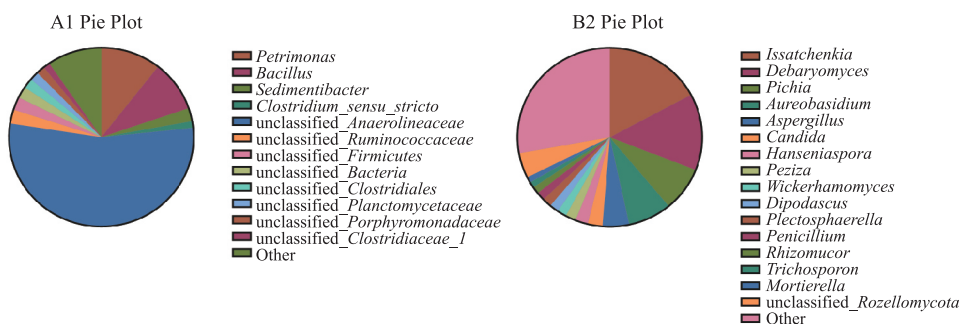


图 8 细菌与真菌群落结构

Fig. 8 Community structure of bacteria and fungi

等级分类的 42 个 KEGG 二级通路见图 9。六大类分别为环境信息处理 (26 363,11.17%)、代谢通路 (149 319,63.26%)、遗传信息处理 (30 109,12.76%)、细胞过程 (15 080,6.39%)、人类疾病 (10 323,4.37%) 和生命系统 (4 848,2.05%)。富集差异表达基因最多的 10 个二级通路为碳水化合物代谢

(Carbohydrate metabolism,28 434)、概观 (Overview, 27 511)、氨基酸代谢 (Amino acid metabolism, 21 910)、能量代谢 (Energy metabolism,17 715)、膜运输 (Membrane transport,16 820)、辅因子和维生素代谢 (etabolism of cofactors and vitamins,13 552)、核苷酸代谢 (Nucleotide metabolism,13 197)、翻译

(Translation, 12 916)、信号传导(Signal transduction, 9 477)、复制和修复(Replication and repair, 9 402)。其中有 149 319 个 unigene 参与微生物新陈代谢, 碳水化合物代谢为主要代谢活动, 有 15 条碳水化合物代谢途径, 包括丙酮酸代谢、糖酵解和糖异生、氨基糖和核苷酸糖代谢以及丁酸代谢等。这些代谢途径表明窖泥具有良好的糖类代谢及风味物质合成的能力。还原糖与氨基酸、蛋白质之间发生的一系

列复杂反应^[10-11]可生成多种香味物质, 也可生产高微量成分的调味液来提高白酒的香味强度^[12]和丰富白酒风味, 如酮、醛、吡嗪、呋喃、酚类等^[13], 而四甲基吡嗪还具有扩张血管、改善微循环及抑制血小板集聚等作用^[14]。窖泥样品中代谢功能旺盛的碳水化合物和氨基酸代谢为还原糖与氨基酸、蛋白质之间的反应提供了基础。

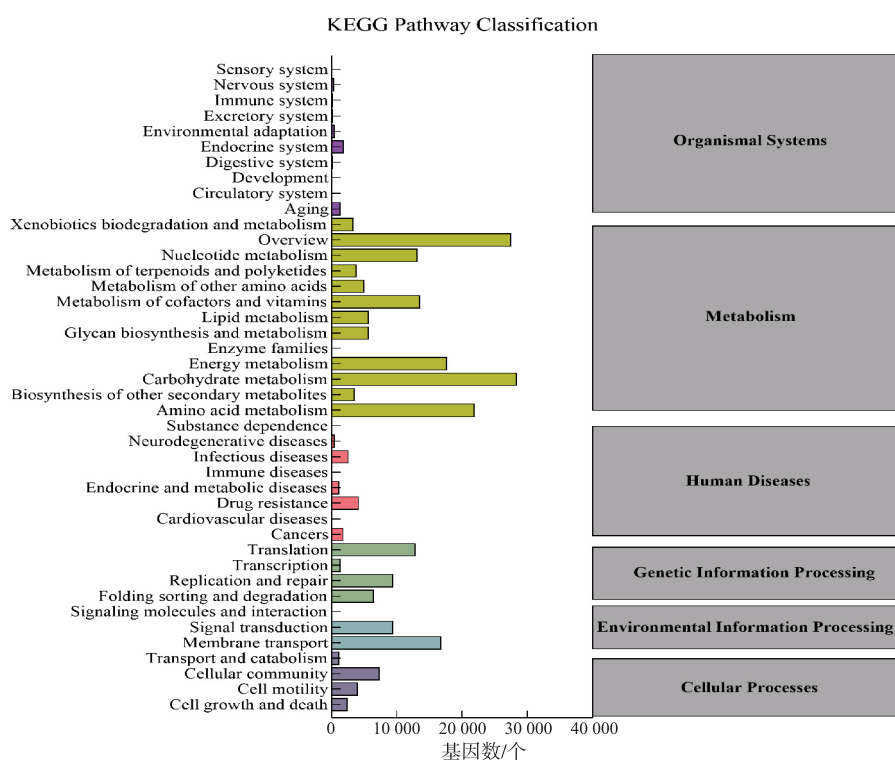


图9 KEGG pathway 功能注释分类

Fig. 9 Functional annotation classification in KEGG pathway

2.2.5 CAzY 功能注释分析 CAzY 是碳水化合物活性酶的数据库, 主要包括糖苷水解酶(GHs)、糖基转移酶(GTs)、多糖裂解酶(PLs)、糖类酯解酶(CEs)和氧化还原酶(AAs)。此外, 还包括碳水化合物结合模块(CBMs)。将宏基因组基因集序列与 CAzY 数据库比对, 共注释到 210 个碳水化合物酶类。窖泥样品中注释到的酶类及数量见图 10。在窖泥样品中糖苷水解酶和糖基转移酶类数量最多, 占总数的 74%。糖苷水解酶能水解寡糖、多糖等各种含糖化合物的糖苷键, 生成单糖、寡糖或糖复合物, 在寡糖、芳香基糖苷的合成、氨基酸和多肽的糖基化方面发挥了重要作用^[15]。糖基化反应是生物体内最为重要的转化反应^[16], 它们将活性糖基从糖基供体转移到

糖基受体, 从而影响糖基受体的水溶性, 改善其化学稳定性和生物活性, 同时维持自身代谢的平衡^[17-18]。糖基转移酶基因分为 98 个家族糖基转移酶, 能催化各种二糖、寡聚糖及多聚糖合成^[19-20]。窖泥中丰富的糖苷水解酶和糖基转移酶有利于糖类的生成、转化及代谢。

2.2.6 COG 功能注释分析 将基因集蛋白质序列与 COG 数据库比较, 对预测蛋白质进行归类和功能注释, 绘制功能注释统计图, 见图 11。窖泥样品中预测蛋白质分属于 23 个主要的功能大类, 未知功能的预测蛋白质最多, 其次为大概的功能预测。这与郑琦^[21]采用宏基因组技术研究浓香型白酒香味类微生物物质代谢相关的基因结果一致。未来随着

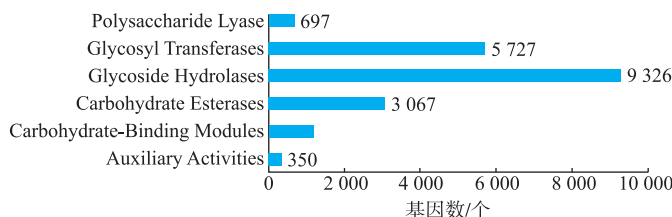


图 10 CAzY 功能注释分类

Fig. 10 Functional annotation classification in CAzY

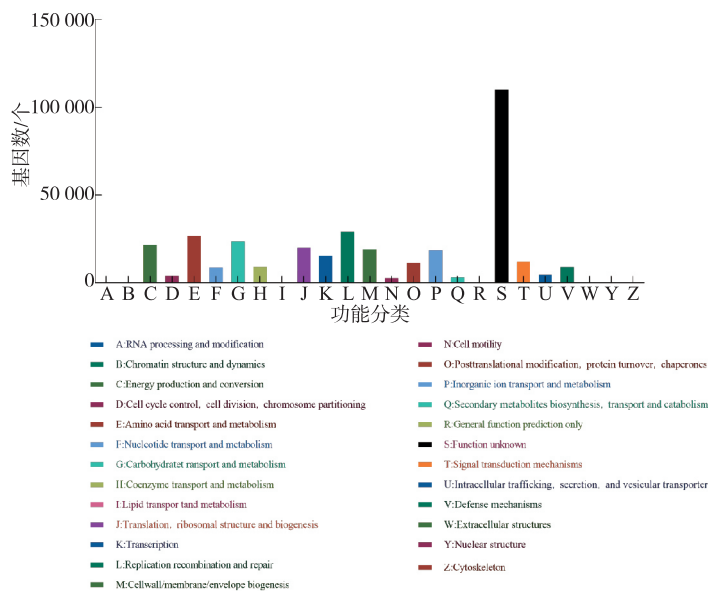


图 11 COG 功能注释分类

Fig. 11 Functional annotation classification in COG

生物信息学的发展,更多的计算方法和技術将被应用到对这部分预测蛋白质的研究。

2.3 糖代谢转运系统基因分析

2.3.1 糖转运系统 窖泥中微生物的糖转运系统分布见表 2。通过对糖转运系统分析发现,山梨糖醇、麦芽糖、甘露糖、海藻糖、N-乙酰氨基葡萄糖、甘露醇、葡萄糖(α -糖苷)、纤维二糖可通过磷酸转移酶系统、渗透酶蛋白和 ABC 转运蛋白 3 种转运系统转运至细胞内代谢;乳糖、阿拉伯糖、鼠李糖、D-阿洛糖和低聚糖等可以通过渗透酶蛋白和 ABC 转运蛋白系统 2 种方式转运;蔗糖、半乳糖、半乳糖醇和 α -葡萄糖苷只能由磷酸转移酶系统转运;果糖可由磷酸转移酶系统和 ABC 转运蛋白系统 2 种方式转运;纤维二糖可由磷酸转移酶系统和渗透酶蛋白系统 2 种方式转运;木二糖只能由特异性 ABC 蛋白转运系统转运。窖泥中甘露糖、甘露醇、甲基半乳糖苷、果糖、蔗糖、乳糖分别有控制基因拷贝数 477、73、233、127、42、60 个,表明白酒酿造过程中窖泥微

生物对甘露糖的转运能力最强。

2.3.2 糖类物质转化成糖酵解途径中间产物的过程分析 窖泥微生物基因组中参与将果糖和甘露糖降解形成糖酵解中间产物的特色代谢通路见图 12。参与将糖类物质转化为糖酵解中间产物的关键酶基因见表 3。

1) D-1-磷酸甘露醇的转化 经过磷酸转移酶系统进入细胞的糖都会发生磷酸化。甘露醇在磷酸转移酶系统酶 II 的作用下发生磷酸化,最终形成 D-1-磷酸甘露醇进入细胞,在 1-磷酸甘露醇-5-脱氢酶的作用下最终转化为糖酵解中间产物 β -D-6 磷酸果糖。

2) 6-磷酸山梨醇的转化 山梨醇在磷酸转移酶系统酶 II 的作用下经磷酸化形成 6-磷酸山梨醇进入细胞,在 6-磷酸山梨醇-2-脱氢酶的作用下最终转化成糖酵解中间产物 β -D-6 磷酸果糖。

3) 麦芽糖的转化 麦芽糖通过渗透酶蛋白进入细胞,在麦芽糖磷酸化酶的作用下直接转化成糖

表 2 窖泥糖转运系统的分布

Table 2 Distribution of sugar transporters in pit mud

糖(醇)	转运蛋白	主宰基因
山梨醇		39
麦芽糖		61
甘露糖	磷酸转移酶系统	477
海藻糖	渗透酶蛋白	16
甘露醇	ABC 转运蛋白	73
N-乙酰氨基葡萄糖		62
葡萄糖(α -葡萄糖糖苷)		129
乳糖		60
D-阿洛糖		22
L-阿拉伯糖		85
鼠李糖		155
D-木糖	渗透酶蛋白	35
木糖醇	ABC 转运蛋白	7
低聚糖		188
赤藓糖醇		29
甲基半乳糖苷		233
蔗糖		42
半乳糖		1
β -葡萄糖苷	磷酸转移酶系统	29
半乳糖醇		126
果糖	磷酸转移酶系统	127
	ABC 转运蛋白	
纤维二糖	磷酸转移酶系统	108
	渗透酶蛋白	
木二塘	ABC 转运蛋白	2

酵解中间产物 β -D-1-磷酸葡萄糖,参与糖酵解途径。

4) D-6-磷酸甘露糖的转化 甘露糖经磷酸转移酶系统最终形成 D-6-磷酸甘露糖进入细胞,在 6-磷酸甘露糖异构酶的作用下转化成 β -D-6-磷酸果糖。

5) 海藻糖的转化 海藻糖可通过渗透酶蛋白、ABC 转运蛋白及磷酸转移酶系统 3 种转运方式进入细胞,在海藻糖磷酸化酶的作用下转化成糖酵解中间产物 β -D-1-磷酸葡萄糖,后者可进一步在 β -磷酸葡萄糖变位酶的作用下转化成 D-6-磷酸葡萄糖。

6) N-乙酰氨基葡萄糖的转化 N-乙酰氨基葡萄糖通过渗透酶蛋白、ABC 转运蛋白及磷酸转移酶系统 3 种转运方式进入细胞,之后经过 N-乙酰氨基葡萄糖焦磷酸化酶和 N-乙酰-1-磷酸氨基葡萄糖转移酶、磷酸葡萄糖胺变位酶、6-磷酸果糖转氨

酶、6-磷酸葡萄糖异构酶等 5 种酶的催化下最终转化为糖酵解中间产物 α -D-6-磷酸葡萄糖。

7) 6-磷酸纤维二糖的转化 纤维二糖通过渗透酶蛋白和磷酸转移酶系统进入细胞,在磷酸转移酶系统酶 II 的作用下磷酸化形成 6-磷酸纤维二糖。在 β -葡萄糖苷酶作用下转化为糖酵解中间产物 α -D-1-磷酸葡萄糖。

8) 乳糖的转化 乳糖通过渗透酶蛋白和 ABC 转运蛋白进入细胞,经过 2 条途径转化为糖酵解的中间产物 α -D-6-磷酸葡萄糖。途径 I、II 分别是在 α -半乳糖苷酶、己糖激酶和葡萄糖激酶、醛糖 1-表异构酶、半乳糖激酶、UPD 葡萄糖-1-磷酸己糖苷酰转移酶和磷酸葡萄糖变位酶的作用下生成糖酵解中间产物 α -D-6-磷酸葡萄糖。

9) D-1 磷酸果糖的转化 果糖通过磷酸转移酶系统进入细胞,最终形成 D-1-磷酸果糖,而后通过 3 条途径转化成糖酵解中间产物 D-3-磷酸甘油醛。3 条途径的关键酶分别为 I 类果糖二磷酸醛缩酶和磷酸丙糖异构酶、1-磷酸果糖激酶和 I 类果糖二磷酸醛缩酶、I 类果糖二磷酸醛缩酶和丙糖激酶。

3 讨论

采用传统分离培养方法得到的细菌主要属有 *Bacillus*、*Brevibacterium*、*Enterobacter* 等,真菌主要属有 *Aspergillus*、*Cladosporium*、*Monascus*、*Penicillium* 等。通过高通量测序结果显示,窖泥中细菌和真菌的优势属为 *Petrimonas* (10.54%)、*Bacillus* (9.21%)、*Issatchenkia* (17.12%)、*Debaryomyces* (13.83%) 等。细菌和真菌的传统分离与高通量测序结果存在些许偏差,这是因为窖泥中大多数微生物为未/难培养微生物,培养条件要求苛刻,很难做到全部纯培养且只能培养出微生物群落中数量占优势的菌群,但传统分离筛选技术仍占有重要的地位^[22]。因此,在分析窖泥微生物的群落结构时要采用 2 种及多种方法,才能得到更为全面、客观的结果。通过检索文献[23-27]发现,城固酒细菌群落组成分类上与同香型白酒具有一定的相似性,特别是 *Bacillus* 在同香型白酒中基本均存在,这是因为窖泥发酵过程中抗逆性强,耐高温的芽孢能适应复杂的酿造环境,并能够为白酒提供香味物质^[28]。但核心菌属与其他白酒产区存在较大差异,城固酒细菌属以 *Petrimonas* 为主,为易降解碳水化合物的发酵细菌^[29-30];真菌属多为



表3 窖泥基因组中参与将糖类物质转化为糖酵解中间产物的关键酶基因分析

Table 3 Gene analysis of key enzymes involved in the transformation of saccharides into glycolytic intermediates in pit mud genome

酶	基因名	拷贝数/基因数
1-磷酸甘露醇-5-脱氢酶[EC:1.1.1.17]	<i>mtlD</i>	38
6-磷酸山梨醇-2-脱氢酶[EC:1.1.1.140]	<i>srlD</i>	33
麦芽糖磷酸化酶[EC:2.4.1.8]	<i>mapA</i>	39
6-磷酸甘露糖异构酶 [EC:5.3.1.8]	<i>manA</i>	166
α -海藻糖磷酸化酶[EC:2.4.1.64]	<i>treP</i>	44
β -磷酸葡萄糖变位酶[EC:5.4.2.6]	<i>pgmB</i>	46
UDP-N-乙酰氨基葡萄糖/乙酰氨基半乳糖二磷酸化酶[EC:2.7.7.232,7.7.83]	<i>UAPI</i>	9
乙酰葡萄糖胺磷酸变位酶[EC:5.4.2.10]	<i>glmM</i>	157
6-磷酸果糖转氨酶[EC:2.6.1.16]	<i>glmS</i>	729
6-磷酸葡萄糖酸异构酶[EC:5.3.1.9]	<i>GPI</i>	610

续表

酶	基因名	拷贝数/基因数
β -葡萄糖苷酶[EC:3.2.1.21]	<i>bglX</i>	1 116
β -半乳糖苷酶[EC:3.2.1.23]	<i>bgaB</i>	129
己糖激酶[EC:2.7.1.1]	<i>HK</i>	195
葡萄糖激酶[EC:2.7.1.2]	<i>glk</i>	1 960
醛糖 1-表异构酶[EC:5.1.3.3]	<i>galM</i>	226
半乳糖激酶[EC:2.7.1.6]	<i>galK</i>	266
UDP 葡萄糖-己糖-1-磷酸尿苷转移酶[EC:2.7.7.12]	<i>galT</i>	273
葡萄糖磷酸变位酶[EC:5.4.2.2]	<i>pgm</i>	1 141
I 类果糖二磷酸醛缩酶[EC:4.1.2.13]	<i>fbaB</i>	308
磷酸丙糖异构酶[EC:5.3.1.1]	<i>TPI</i>	1 062
1-磷酸果糖激酶[EC:2.7.1.56]	<i>fruK</i>	64
丙糖激酶[EC:2.7.1.28]	<i>DAK</i>	15

酵母菌,两者显著区别于其他产区的群落结构,这表明城固酒糖代谢途径更为活跃也更复杂,出酒率更快更高,使得城固酒酿造周期显著缩短于其他产区且具有自身独特的白酒风味。由此可见,不同酿造环境、原料、水质等的不同对窖泥中微生物的多样性影响很大,这造成了不同地域白酒风味特点的差异。

4 结 语

通过 KEGG 数据库比对,共注释了 236 022 个 unigene,碳水化合物代谢为主要代谢活动,有 15 条碳水化合物代谢途径。通过 CAzY 数据库比对,共注释到 210 个碳水化合物酶类,其中糖苷水解酶和糖基转移酶类数量最多,占碳水化合物活性酶总数的 74%,这可能与城固窖泥中以 *Petrimona* 主的易降解碳水化合物的发酵细菌有关,在大量糖基转移酶和

糖苷水解酶的作用下能快速降解糖类,从而为糖类的进一步生成、转化及代谢提供了物质基础和反应条件。

在糖代谢途径中,窖泥编码了多种糖类的糖转运系统基因,通过 3 种不同的转运方式将相关糖类物质转运至细胞内,具备将多种糖类物质转化为糖酵解中间产物的关键酶基因,其中对甘露糖的转运能力最强,这与夏亚男采用宏基因组测序分析酒醅糖转运系统结果一致^[30]。甘露糖作为葡萄糖的异构体和多种多糖的组成成分,通过多种糖代谢途径转化和生成,并参与糖酵解过程。作者在分析窖泥微生物多样性的基础上,进一步研究了窖泥微生物代谢活动及糖代谢过程的关键基因,为后续进一步筛选及应用功能菌株,分析其在代谢通路中的作用和关键酶基因,为城固酒窖泥的改善、制备及品质的提升提供理论依据。

参考文献:

- [1] 于单. 中国不同香型白酒香气物质的鉴定研究[D]. 上海:上海应用技术学院,2015.
- [2] 章庆国. 城固酒史三千年 香溢华夏写春秋[J]. 陕西政报,2000(24):35-36.
- [3] 杜礼泉. 窖泥及窖泥功能菌液微生物群落的研究进展与发展趋势[J]. 中国酿造,2018,37(10):1-4.
- [4] 卢萌萌,任聪,聂尧,等. 白酒酿造窖泥未培养微生物菌群的可培养化策略[J]. 食品与发酵工业,2020,46(19):9-16.
- [5] 麻颖垚,胡萍,孙利林,等. 不同研究方法在白酒微生物多样性研究中的应用[J]. 食品与发酵科技,2020,56(3):78-83.
- [6] 晋湘宜,蔡开云,陈萍,等. 中国白酒酿酒微生物研究概述[J]. 酿酒,2020,47(5):16-21.
- [7] 江鹏,何朝玖,刘燕梅,等. 浓香型大曲白酒窖泥微生物研究进展[J]. 中国酿造,2020,39(4):19-22.
- [8] HE G Q, LIU T J, SADIQ F A, et al. Insights into the microbial diversity and community dynamics of Chinese traditional fermented foods from using high-throughput sequencing approaches[J]. *Journal of Zhejiang University-SCIENCE B*, 2017, 18(4):289-302.
- [9] 闫绍鹏,杨瑞华,冷淑娇,等. 高通量测序技术及其在农业科学研究中的应用[J]. 中国农学通报,2012,28(30):171-176.

- [10] WALLER G R, FEATHER M S. The Maillard Reaction in Foods and Nutrition[M]. Washington D C: ACS, 1983: 489-491.
- [12] 周国红, 李彩, 董士海. 美拉德反应对白酒香味的影响[J]. 安徽农业科学, 2012, 40(3): 1461-1462.
- [13] 庄名扬. 再论美拉德反应产物与中国白酒的香和味[J]. 酿酒科技, 2005(5): 34-38.
- [14] 吴建峰. 中国白酒中健康功能性成分四甲基吡嗪的研究综述[J]. 酿酒, 2006(6): 13-16.
- [15] IRENA M, TOM T, DANIEL W, et al. The role of *Petrimonas mucosa* ING2-E5AT in mesophilic biogas reactor systems as deduced from multiomics analyses[J]. **Microorganisms**, 2020, 8(12): 2024-2024.
- [16] CAMPBELL J A, DAVIES G J, BULONE V, et al. A classification of nucleotide-diphospho-sugar glycosyltransferases based on amino acid sequence similarities[J]. **Biochemical Journal**, 1997, 326(3): 929-939.
- [17] 田鹏, 刘占林. 糖基转移酶超家族[J]. 生命的化学, 2011, 31(5): 732-736.
- [18] WEIS M, LIM E K, NEIL C, et al. Bowles. Engineering and kinetic characterisation of two glucosyltransferases from *Arabidopsis thaliana*[J]. **Biochimie**, 2008, 90(5): 830-834.
- [19] BUETTNER F F R, ASHIKOV A, TIEMANN B, et al. Elegans DPY-19 is a C-mannosyltransferase glycosylating thrombospondin repeats[J]. **Molecular Cell**, 2013, 50: 295-302.
- [20] 赵卓丽. 瑞滇热泉原核微生物多样性研究及纤维素酶和木聚糖酶资源挖掘[D]. 新乡: 河南师范大学, 2019.
- [21] 郑琦. 浓香型白酒微生物生物物质代谢机制及其转化与利用[D]. 福州: 福建农林大学, 2015.
- [22] 唐贤华, 黄睿, 王思思, 等. 浓香型白酒窖泥微生物研究综述[J]. 酿酒, 2019, 46(2): 12-14.
- [23] 王明跃, 张文学, 王海英, 等. 不同窖龄窖泥细菌的系统发育多样性分析[J]. 食品科学, 2013, 34(11): 177-181.
- [24] 赵东, 郑佳, 彭志云, 等. 高通量测序技术解析五粮液窖泥原核微生物群落结构[J]. 食品与发酵工业, 2017, 43(9): 1-8.
- [25] 任聪, 辜杨, 杜海, 等. 基于新老窖泥的微生物菌群结构判定浓香型白酒生产中的主体己酸菌[J]. 食品与发酵工业, 2018, 44(12): 8-14.
- [26] 勾文君, 田源, 孔小勇, 等. 洋河酒窖泥细菌群落结构与菌株产酸能力分析[J]. 微生物学通报, 2020, 47(6): 1651-1661.
- [27] 孟雅静, 张会敏, 王艳丽, 等. 浓香型白酒窖泥的真核菌群结构分析[J]. 现代食品科技, 2020, 36(5): 96-103.
- [28] 周晓龙. 北派酱香大曲的细菌群落分析及增香芽孢杆菌的筛选及应用[D]. 济南: 齐鲁工业大学, 2020.
- [29] GRABOWSKI A, TINDALL B J, BARDIN V, et al. *Petrimonas sulfuriphila* gen. nov., sp. nov., a mesophilic fermentative bacterium isolated from a biodegraded oil reservoir[J]. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, 2005, 55(3): 1113-1121.
- [30] 夏亚男, 双全. 基于宏基因组技术分析固态发酵枣酒酒醅的微生物多样性及关键风味基因[J]. 食品科学, 2022, 43(2): 192-198.