DOI:10.12441/spyswjs.20231031002 [文章编号] 1673-1689(2025)06-0162-11

高温大曲中曲皮和曲心的理化指标、微生物多样性和挥发性物质研究

谢 丹 吴 成 赵雯宇 胡建锋 程平言 毕远林 杨军林 尤小龙 汪地强*

(贵州习酒股份有限公司,贵州 遵义 564622)

摘要:【目的】探究高温大曲中曲皮和曲心的理化指标、微生物多样性和挥发性物质。**【方法】**采用高通量测序技术联合顶空固相微萃取-气相色谱-质谱联用技术(HS-SPME-GC-MS)等对3种大曲的曲皮和曲心这2个部位的微生物群落多样性、理化指标及挥发性物质之间的差异性进行研究。**【结果】**在理化指标方面,3种大曲的曲皮水分质量分数显著低于曲心(P<0.05),其中白曲曲皮(WP)的水分质量分数最低,黄曲曲心(YX)水分质量分数最高;曲皮、曲心的酸度大小依次为:黑曲曲心(BX)>YX>黑曲曲皮(BP)>白曲曲心(WX)>黄曲曲皮(YP)>WP。高通量测序结果表明:Firmicutes、Proteobacteria为大曲的优势细菌门,Ascomycota为优势真菌门;在属水平上,BP、BX、YX以*Pseudomonas_E*为主要优势细菌属;WP以*Blastococcus*为主要优势细菌属;WX以*Scopulibacillus*为主要优势细菌属;所有样品中,以*Thermomyces*为主要优势真菌属,但其相对丰度存在一定差异,且酱香型高温大曲中曲皮的微生物多样性优于曲心。冗余分析(redundancy analysis,RDA)结果表明:WP与水分质量分数和温度呈正相关,YX、BX与酸度呈正相关,且曲皮、曲心的微生态环境差异是导致其微生物群落结构差异的重要原因之一。大曲中曲皮、曲心的76种挥发性物质的定量分析结果表明:在酯类物质中,乙酸乙酯在WP中的质量分数较高;在醛类物质中,苯甲醛在BX中的质量分数较高;在酸类物质中,异戊酸在WX中的质量分数最高;在吡嗪类化合物中,四甲基吡嗪在WX中的质量分数最高,表明不同大曲的曲皮、曲心中的挥发性物质质量分数存在一定的差异性。**【结论】**该研究可为后续研究酱香型高温大曲微生物群落进化和挥发性物质的机制研究提供理论依据。

关键词:高温大曲;曲皮;曲心;微生物多样性;挥发性物质

Physicochemical Indicators, Microbial Diversity, and Volatile Substances in the Qupi and Quxin of High-temperature Daqu

*XIE Dan WU Cheng ZHAO Wenyu HU Jianfeng CHENG Pingyan BI Yuanlin YANG Junlin YOU Xiaolong WANG Diqiang**

(Guizhou Xijiu Co., Ltd., Zunyi 564622, China)

Abstract: [**Objective**] This study aims to explore the physicochemical indicators, microbial diversity, and volatile substances in the Qupi (surface) and Quxin (core) of high-temperature Daqu. [**Method**] High-throughput sequencing and headspace solid-phase microextraction coupled with gas chromatography-mass spectrometry (HS-SPME-GC-MS) were employed to compare the microbial diversity, volatile substances, and physicochemical indicators between Qupi and Quxin of three types of Daqu. [**Result**] The moisture mass fraction in Qupi of the three types of Daqu was lower than that in Quxin (P<0.05), and the moisture mass fraction was the lowest in the

基金项目:贵州省科技支撑计划项目(黔科合支撑[2023]一般342,黔科合支撑[2023]一般343);贵州省工业和信息化发展专项资金项目(黔财工[2023]153号)。

通信作者:汪地强(1976—),男,博士,工程技术应用研究员,主要从事白酒酿造与风味研究。E-mail:diqiangwang@163.com

收稿日期:2023-10-31 **修回日期:**2023-12-25

Qupi of white Daqu (WP) and the highest in the Quxin of yellow Daqu (YX). The acidity of Qupi and Quxin were in the order of Quxin of black Daqu (BX) > YX > Qupi of black Daqu (BP) > Quxin of white Daqu (WX) > Qupi of yellow Daqu (YP) > WP. High-throughput sequencing results showed that Firmicutes and Proteobacteria were the dominant bacterial phyla, and Ascomycota was the dominant fungal phylum in Daqu. At the genus level, *Pseudomonas_E* was the dominant bacterial phyla in BP, BX, and YX; *Blastococus* was the dominant bacterial phyla in WP; and *Scopulibacillus* was the dominant bacterial phyla in WX. *Thermomyces* was the dominant fungal genus in all the samples, while its relative abundance varied among samples. In addition, the microbial diversity in Qupi of Jiangxiangxing high-temperature Daqu was higher than that in Quxin. The redundancy analysis (RDA) results indicated that moisture content and temperature were positively correlated with WP, and YX and BX were positively correlated with acidity. The microbial community structure difference between Qupi and Quxin was mainly attributed to the micro-ecosystem difference. The quantitative analysis results of 76 volatile substances in Qupi and Quxin showed that among esters, the mass fraction of ethyl acetate in WP was relatively high; among aldehydes, the mass fraction of benzaldehyde in BX was relatively high; among acids, isovaleric acid has the highest mass fraction in WX; among pyrazines, tetramethyl pyrazine has the highest mass fraction in WX. The results indicated the mass fractions of volatile substances were different in Qupi and Quxin of different types of Daqu. [**Conclusion**] This study provides a theoretical foundation for further research on the evolution of microbial communities and the mechanism of volatile substances in Jiangxiangxing high-temperature Daqu.

Keywords: high-temperature Daqu; Qupi; Quxin; microbial diversity; volatile substances

酱香型白酒是中国白酒典型代表之一，通常以高温大曲为糖化发酵剂经固态发酵酿制而成。高温大曲以纯小麦为原料，添加母曲自然接种、经40 d高温堆积发酵形成，最高发酵温度可达60~70 ℃[1-2]。高温大曲为酿酒提供了一定的原料，同时也是微生物和生物酶的主要来源之一，对酱香型白酒典型风味特征的形成具有关键作用。在堆积发酵过程中，由于发酵仓位置、温度和水分质量分数等工艺参数不同，使其形成了3种不同感官特性的高温大曲：黄曲、白曲和黑曲[3-4]。Wang等[5]采用高通量测序技术对黄曲、白曲和黑曲中的细菌群落组成进行了对比分析，发现3种大曲的细菌群落结构存在显著差异，但都以嗜热细菌为主。王颖等[6]研究了不同产区黄曲、白曲、黑曲的理化指标、酶活力和挥发性物质，发现不同产区的黄曲和白曲比黑曲的成分多样性差异更小。张巧玲等[7]对拆曲环节的3种大曲进行氨基酸分析，结果表明黑曲中游离氨基酸含量最高，白曲最低。相关研究表明，酱香型大曲中存在259种挥发性成分，以酯类和醇类物质为主，其次为吡嗪类、醛类、酮类、酸类、酚类、脂肪烃等[8]。

近些年，随着分子生物学及检测技术的快速发展，研究者对高温大曲物系、菌系和酶系的认识不断深入。Zheng等[9]的研究表明，大曲不同部位的微生物数量和种类存在差异，会影响其代谢过程中产生的生物热及功能，从而影响制酒过程原粮的消耗。邓长阳等[10]对襄阳地区中高温大曲的曲皮和曲心的真菌多样性进行了研究，表明曲皮和曲心的真菌群落组成存在显著差异，主要是由*Rhizomucor*和*Thermoascus*等低丰度真菌属造成的。曲皮和曲心细菌多样性也不同，曲皮中细菌群落的多样性高于曲心，但其物种丰富度低于曲心，存在特有的优势细菌属[11]。但目前对3种不同感官特性高温大曲的曲皮和曲心理化性质、微生物群落组成及挥发性成分缺乏系统性研究。因此，作者运用高通量测序和HS-SPME-GC-MS等技术，对比分析3种不同感官特性高温大曲中曲皮和曲心的理化指标、微生物群落组成和挥发性物质的异同，为进一步解析黄曲、白曲和黑曲形成机理及优化酱香型白酒高温大曲比例提供数据支撑。

1　材料与方法

1.1　材料与试剂

孟加拉红培养基、营养琼脂：北京奥博星生物技术有限责任公司；WL培养基：上海博微生物科技有限公司；DNA提取试剂盒：美国OMEGA

BioTek 公司；聚合酶链式反应引物：上海翌圣生物科技股份有限公司。

1.2 仪器与设备

HS-SPME-GC-MS：8890-5977B 型，美国安捷伦公司；自动蒸汽灭菌器：KG-AP32L 型，日本 ALP 公司；漩涡混合器：GL-88B 型，海门市其林贝尔仪器制造有限公司；混匀型干式恒温器：TND03-H-H 型，深圳托能达科技有限公司；PCR 仪：ETC811 型，北京东胜创新生物科技有限公司；电泳仪：DYCZ-21 型，北京市六一仪器厂；凝胶成像系统：FR-1000 型，上海复日科技有限公司。

1.3 方法

1.3.1 样品采集

高温大曲样品采集自贵州习酒股份有限公司制曲车间。大曲经高温堆积发酵结束后，按照曲仓不同发酵位置（窗、门和中间）及不同堆积层数（上层、中层、下层）分别各取一块黄曲、白曲和黑曲，共采集样品 27 份，将采集综合样置于无菌密封取样袋中，−4 ℃保存并带回实验室，取样示意图如图 1 所示。将所采集的大曲样品分别按黄曲、白曲、黑曲分类后，按照大曲表皮向内延伸 0~3 cm 为曲皮，大曲由曲心向外延伸 0~3 cm 为曲心[12]；分别按曲皮、曲心取样后，将不同类别的大曲均匀混合成综合样品，分别命名为 YP、YX、BP、BX、WP、WX，共计 6 个，取样示意图如图 2 所示。分别用于分析检测大曲理化指标、微生物群落组成和挥发性物质组成。

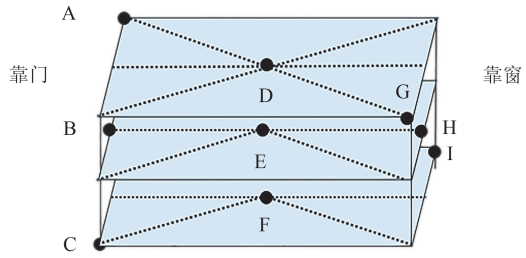


图 1 发酵房内大曲取样位置示意图

Fig. 1 Schematic diagram of sampling positions for Daqu in the fermentation room



图 2 3 种大曲的曲皮、曲心取样位置示意图

Fig. 2 Schematic diagrams of sampling positions for Qupi and Quxin of three types of Daqu

1.3.2 理化指标的测定

参照 QB/T 4257—2011《酿酒大曲通用分析方法》的方法测定温度、水分质量分数、酸度、糖化力[13]。

1.3.3 大曲总 DNA 提取及扩增总 DNA

参照谢丹等[14]和吴成等[15]的方法提取总 DNA，并进行 PCR 扩增。

1.3.4 高通量测序

采用 Illumina MiSeq 测序平台，分别对细菌 16S rRNA 基因 V3—V4 区、真菌 ITS3—ITS4 区进行高通量测序分析，由生工生物工程（上海）股份有限公司完成。

1.3.5 挥发性物质分析

利用 HS-SPME-GC-MS 分析大曲的挥发性物质。样品前处理：称取 3 g 粉碎大曲样品于 15 mL 顶空瓶中，加入 3 mL 饱和 NaCl 溶液及 50 μL 内标溶液。HS-SPME-GC-MS 条件：在 60 ℃条件下孵化 10 min，萃取 40 min；进样口温度为 260 ℃，解吸 2 min 后自动进行 GC-MS 分离鉴定。定性与半定量分析：检测出的挥发性物质通过 NIST 库对比鉴定，筛选相似度大于 80% 的鉴定结果；以 2-乙基丁酸为内标，采用面积归一化法对各挥发性物质进行定量分析。

1.4 数据统计及处理

分别使用 UNITE 和 Silva 为参考数据库，以基于 97% 相似水平的操作分类单元（operational taxonomic units，OTU）代表序列进行真菌和细菌分类学注释分析，利用 QIIME 软件对样本进行 Chao1 指数、Shannon 指数和 Simpson 指数分析，采用 Origin 2022 软件绘制物种相对丰度柱状图，采用 IBM SPSS Statistics 23.0 软件进行显著性分析，使用 Canoco 5 软件进行 RDA 分析，使用 Simca 软件进行偏最小二乘法（PLS-DA）分析，使用 TBtools 软件绘制相对丰度热图。

2 结果与讨论

2.1 高温大曲的曲皮和曲心理化指标对比分析

水分质量分数、酸度、糖化力等理化指标常用于评价高温大曲的品质优劣。水分质量分数在制曲过程中与微生物的生长和酶的生成密切相关。由表 1 可知，3 种大曲的曲皮水分质量分数显著低于曲心（P<0.05），其中 WP 的水分质量分数最低，为（7.50±0.15）%；YX 的水分质量分数

最高，为（13.10±0.18）%；其次是BX的水分质量分数，为（11.10±0.34）%。由于大曲在发酵前期温度低，发酵后期发酵不良，在发酵堆外围容易产生白曲，因此，发酵过程中WP水分散失较快。

表1　3种大曲的曲皮、曲心理化指标检测结果

Table 1　Test results of physicochemical indicators for Qupi and Quxin of three types of Daqu

样品	水分质量分数/%	酸度/（mmol/g）	糖化力/（mg/g·h）	温度/℃
WX	10.80±0.42^{c}	0.13±0.01^{d}	83.65±1.35^{a}	30.20±0.55^{c}
WP	7.50±0.15^{e}	0.08±0.01^{e}	67.15±0.95^{b}	25.20±0.63^{e}
YX	13.10±0.18^{a}	0.20±0.01^{b}	36.22±1.08^{d}	35.50±0.51^{a}
YP	7.60±0.20^{e}	0.12±0.02^{d}	29.78±0.73^{e}	30.30±0.95^{c}
BX	11.10±0.34^{b}	0.30±0.03^{a}	45.34±0.98^{c}	33.10±0.85^{b}
BP	8.50±0.19^{d}	0.17±0.02^{c}	35.67±1.35^{d}	28.30±0.92^{d}

注：同列不同小写字母表示不同样品间的理化指标差异显著（P<0.05）。

相关研究表明，大曲的酸度主要来源于产酸微生物降解蛋白质、脂肪、淀粉等营养物质以及微生物的有机酸代谢，是微生物综合作用的结果[16]。试验结果表明，3种大曲中曲皮和曲心的酸度大小为：BX>YX>BP>WX>YP>WP，其中BX的酸度最高，为（0.30±0.03）mmol/g；WP的酸度最低，为（0.08±0.01）mmol/g。

由糖化力检测结果可知，WX和WP的糖化力高于其他2种类型的大曲，其中，WX糖化力最高，为（83.65±1.35）mg/（g·h），YP的糖化力最低。有研究表明，糖化力指标受工艺控制参数的影响，糖化力的高低决定了小麦发酵是否顺利，并且与产品风格密切相关[17]。

2.2　高温大曲中曲皮和曲心的微生物多样性分析

2.2.1　α多样性分析

待测样品完成测序后，原始序列经去除嵌合体、过滤等处理后共得到562 667条有效序列，其中细菌284 048条、真菌278 619条。α多样性可以反映样品整体微生物丰度和多样性，描述其微生物群落特征。待测样品中细菌和真菌测序覆盖率均为99%以上，表明其测序深度足够[18]，样品中几乎所有微生物群落均被检出，测序结果可真实地反映样品中细菌和真菌群落多样性组成情况。由表2可知，对于细菌而言，YP中Shannon指数最大、Simpson指数最小，表明YP微生物群落多样性最丰富；对于真菌而言，WP中Shannon指数值最大、Simpson指数最小，表明WP微生物群落多样性最丰富。

表2　不同类型大曲中细菌和真菌的α多样性分析

Table 2　Bacterial and Fungal α diversity of different types of Daqu

类别	样品	OTU	Shannon指数	Chao1指数	Ace指数	Simpson指数	覆盖率/%
细菌	BP	131.00	2.11	135.00	133.58	0.29	100
	BX	121.00	2.02	123.00	125.03	0.30	100
	WP	114.00	1.64	125.67	133.19	0.40	100
	WX	70.00	1.18	79.55	81.84	0.45	100
	YP	105.00	2.30	111.56	116.23	0.15	100
	YX	118.00	1.85	126.25	124.13	0.30	100
真菌	BP	294.00	1.48	364.71	337.01	0.54	100
	BX	209.00	0.91	244.84	253.71	0.74	100
	WP	339.00	2.93	372.11	366.71	0.15	100
	WX	222.00	0.89	283.18	283.58	0.75	100
	YP	228.00	1.53	263.36	272.71	0.46	100
	YX	225.00	0.93	333.00	387.22	0.73	100

2.2.2　基于门、属水平上微生物菌属种多样性分析

图3~6中所展示的均为相对丰度至少在一个大曲样品中大于1%的菌群结构。酱香型高温大曲样品经高通量测序共检出细菌15个门、18个纲、45个目、67个科、115个属。在门水平上，Firmicutes、Proteobacteria为大曲中的优势细菌门，Firmicutes在WX样品中的相对丰度占比为84.26%，Proteobacteria在YX样品中的相对丰度占比为96.40%。同时，真菌共检出7个门、28个纲、64个目、142个科、235个属，其中Ascomycota为优势真菌门，Ascomycota在所有样品中的相对丰度占比均最大，在BP、BX中的相对丰度占比分别为95.52%、94.80%。谢丹等[19]的研究表明，高温大曲细菌多样性在门水平以Firmicutes为主导。赵驰等[20]的研究表明，酱香型高温大曲中真菌多样性以Ascomycota为主要优势菌门，Ascomycota中的*Saccharomyces*是白酒酿造过程中数量最多的酵母菌群，也是乙醇生产效率最高的酵母菌群[21]。

在属水平上，BP、BX、YX以*Pseudomonas_E*为主要优势细菌属，其在BP、BX、YX中的相对丰度占比分别为52.43%、53.53%、51.41%；在WP中，*Blastococcus*（61.56%）为主要优势细菌属；在WX中，*Scopulibacillus*（62.77%）为主要优势细菌属；

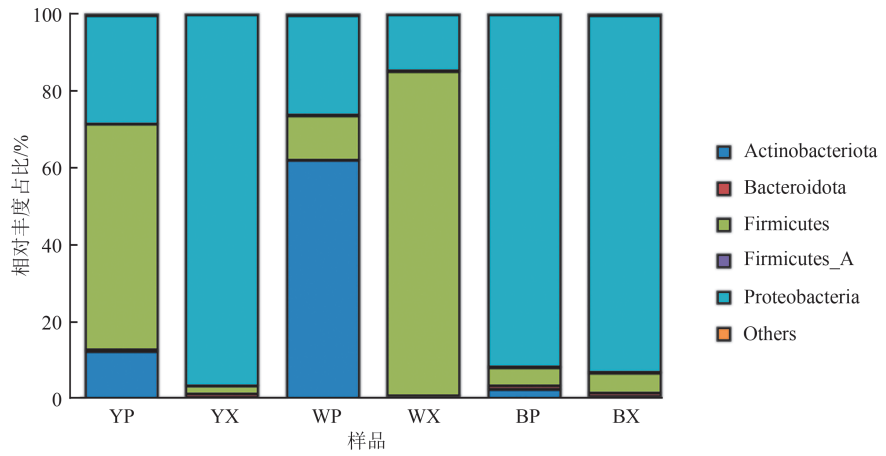


图 3　门水平的细菌相对丰度占比

Fig. 3　Relative abundance of bacteria at the phylum level

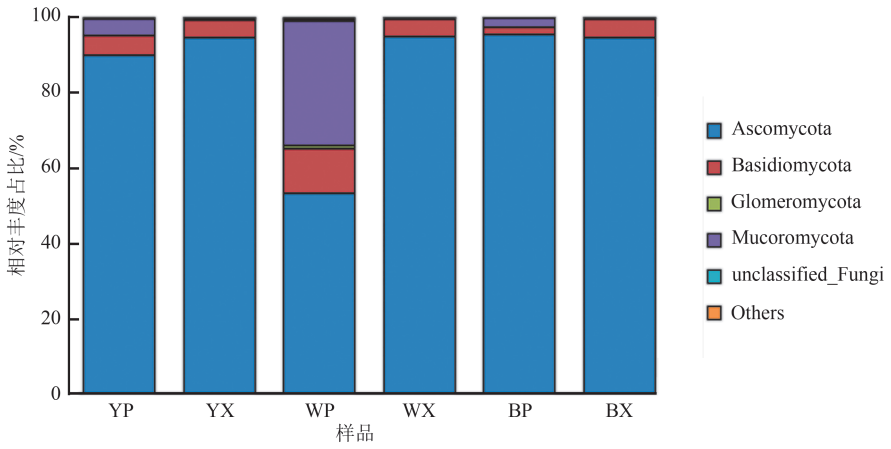


图 4　门水平的真菌相对丰度占比

Fig. 4　Relative abundance of fungi at the phylum level

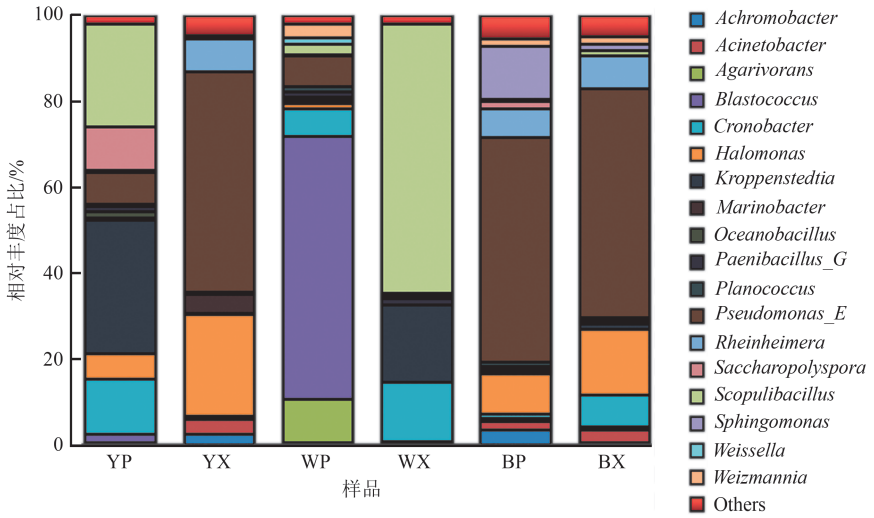


图 5　属水平的细菌相对丰度占比

Fig. 5　Relative abundance of bacteria at the genus level

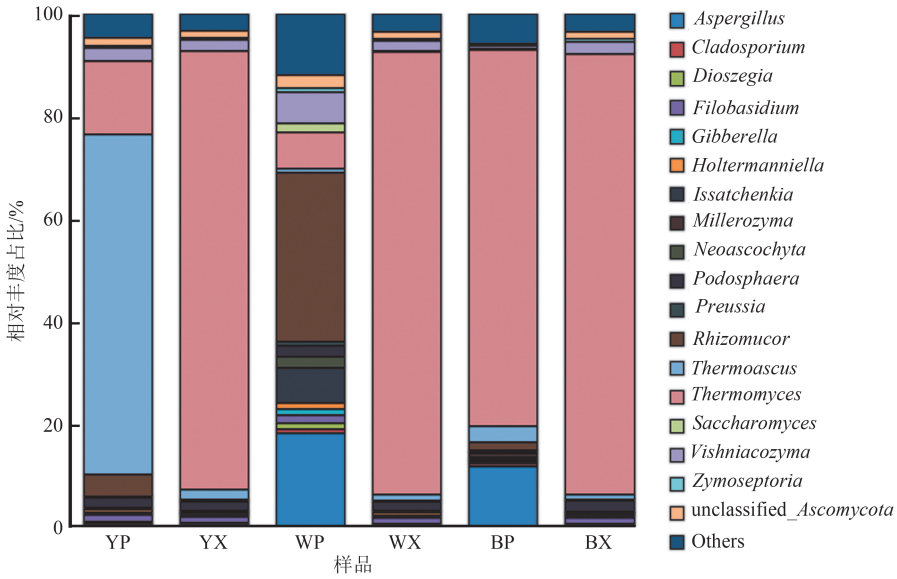


图 6　属水平的真菌相对丰度占比

Fig. 6　Relative abundance of fungi at the genus level

Weissella 菌属存在于 3 种大曲中，但相对丰度占比均较低；*Scopulibacillus* 在 WX 中的相对丰度占比最高，为 62.77%。在真菌中，*Thermomyces* 为主要优势真菌属，在所有样品中均检出，其在 YX、BX、WX、BP 中的相对丰度占比分别为 85.53%、85.87%、86.44%、73.32%；YP 样品中 *Thermoascus*（66.12%）为主要优势真菌属；WP 样品中 *Rhizomucor*（33.01%）为主要优势真菌属。该结果表明，大曲不同部位所含的微生物菌群在种类上差异不明显，但其相对丰度占比存在一定差异，且酱香型高温大曲微生物多样性主要表现为曲皮优于曲心，这与莫祯妮等[11]的研究结果一致。在高温大曲制作过程中，曲房发酵堆心的大曲中曲心温度最高可达 65 ℃，大多数不耐高温的微生物难以存活。因此，从温度表征来看，曲皮微生物多于曲心，白曲微生物种类多于黄曲和黑曲，这表明酱香型高温大曲中曲皮、曲心的优势微生物组成对其本身及后续发酵过程中微生物菌群结构及生长代谢都具有重要影响[22]。

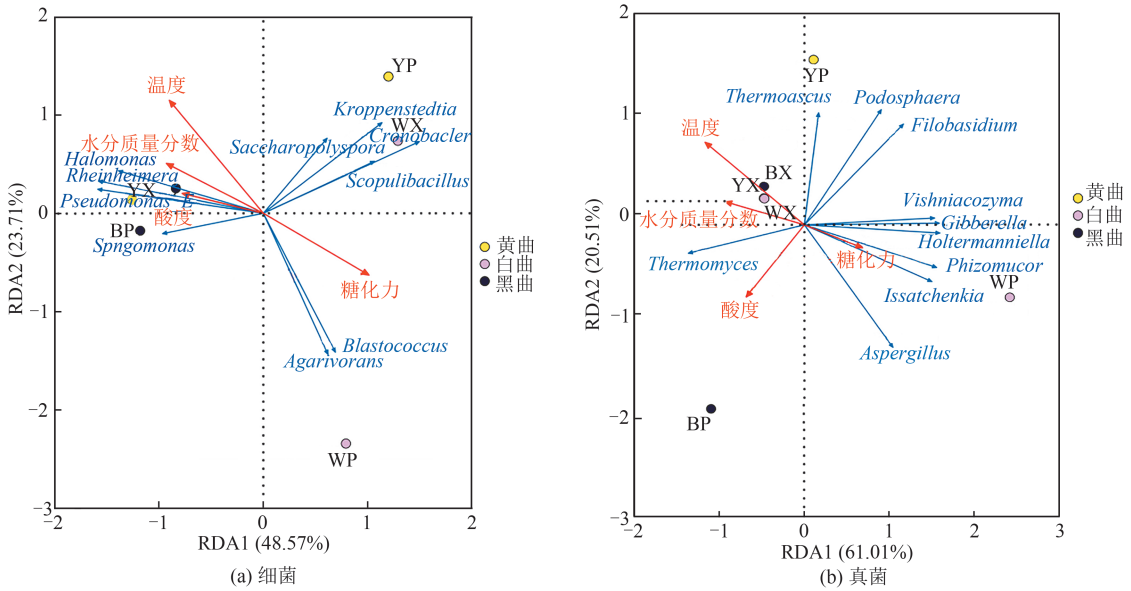
2.2.3　大曲微生物与其理化指标的相关性分析

大曲的理化因子变化对其微生物的生长繁殖及其行为具有较强的影响，进而可调控微生物群落的结构及其演替[23]。为探究酱香型高温大曲理化因子对其优势微生物群落的影响，选取相对丰度占比排名前 10 的优势细菌属、优势真菌属与大曲理化因子进行相关性分析。

如图 7（a）所示，对细菌而言，从不同类型大曲与微生物之间的相关性可知，WP 与 *Agarivorans*、*Blastococcus* 呈正相关；YX、BX 与 *Halomonas*、*Pseudomonas_E*、*Rheinheimera* 呈正相关；YP、WX 与 *Saccharopolyspora*、*Kroppenstedtia*、*Scopulibacillus* 呈正相关。从环境因子与微生物之间的相关性可知，*Blastococcus* 与糖化力呈正相关；*Halomonas*、*Pseudomonas_E*、*Rheinheimera* 与酸度、水分质量分数、温度呈正相关。左乾程等[24]的研究表明，*Saccharopolyspora*、*Kroppenstedtia* 主要来源于酿酒环境的空气和生产用的大曲，是酿造环境的优势细菌。

如图 7（b）所示，对真菌而言，从不同类型大曲与微生物之间的相关性可知，WP 与 *Issatchenkia*、*Rhizomucor*、*Holtermanniella*、*Vishniacozyma*、*Gibberella*、*Aspergillus* 呈正相关；YP、BP 与 *Thermomyces* 呈正相关；从环境因子与微生物之间的相关性可知，*Issatchenkia*、*Aspergillus*、*Gibberella* 等真菌菌属与温度、水分质量分数呈负相关，*Thermomyces* 与温度、糖化力呈正相关。其中 *Thermomyces* 作为一种生长上限温度很高的真菌，具有较高的酶活性，且耐热，是高温大曲中常见的真菌，产生的多种耐热水解酶有助于白酒堆积糖化发酵，从而对酱香风味的形成起重要作用[25-27]。

从不同类型大曲与理化因子之间的相关性可知，WX与发酵水分质量分数和温度呈正相关；BP与酸度呈正相关。从酱香型高温大曲理化因子对其微生物的相关性分析发现，水分质量分数、温度对微生物的生长繁殖影响较大，且理化特性在构造微生物群落结构和环境中起着重要作用，能够影响微生物群落结构组成。微生物群落的生长代谢情况同样影响理化指标，特别是由于微生物生物热引起的温度升高以及由于微生物代谢产酸对酸度和pH的影响[27-29]。这也表明了酱香型高温大曲中曲皮、曲心的微生态环境差异是导致其微生物群落结构差异的重要原因之一，曲皮、曲心理化因子的差异在一定程度上能够解释曲皮、曲心的微生物群落结构差异。



理化因子箭头间的夹角代表正、负相关性。

图 7　微生物群落与理化因子的相关性分析

Fig. 7　Correlation analysis between microbial community and physicochemical indicators

2.3　大曲挥发性物质分析

2.3.1　大曲的曲皮、曲心挥发性物质分析

3种不同类型大曲的曲皮、曲心6个样品中共检出76种挥发性物质，对其进行定量分析[30]。根据检出物质，可归纳为酯类物质18种、酸类物质15种、醛类物质9种、吡嗪类物质9种、醇类物质8种、酮类物质6种、芳香族化合物6种及其他类挥发性物质5种。对其中质量分数较高的32种物质进行挥发性成分热图绘制，结果如图8所示。酯类物质中，WP中的乙酸乙酯质量分数较高（35.25 μg/g），其次是YP（6.15 μg/g）；醛类物质中，BX中的苯甲醛质量分数较高（15.47 μg/g）；酸类物质中以异戊酸为主，其在WX中的质量分数最高（21.58 μg/g），其次是WP（16.36 μg/g）和BP（15.46 μg/g）；醇类物质以苯乙醇为主，其在YX中的质量分数为14.62 μg/g；吡嗪类化合物四甲基吡嗪在大曲中的质量分数较高，其在WX的质量分数最高（34.78 μg/g），其次是WP（21.57 μg/g）和YX（10.01 μg/g）。该结果表明不同大曲的曲皮、曲心中的挥发性物质水平存在一定差异。其中，四甲基吡嗪在白酒中主要由美拉德反应生成，在制曲和堆积发酵过程中均有产生；醇类物质为大曲和白酒中公认的风味成分，有甜香、焦香和酒香等风味特征[31-32]。有研究发现，酯类物质通常有怡人的果香、花香和甜香等气味，是白酒中十分重要的成分，也可能是影响大曲香气的重要物质之一[33]。

2.3.2　大曲中曲皮、曲心的PLS-DA分析

为研究不同类型酱香型高温大曲中挥发性物质间差异性，采用PLS-DA筛选出预测变量重要度（VIP）>1的潜在差异物质，再通过*t*检验进一步验证，筛选出不同位置大曲的差异物质，并进行差异性分析，结果见图9。PLS-DA得分见图9（a），样本均在95% Hotelling的T平方椭圆内，表明大曲样本中无异常值；红色表示QC样品，其他颜色表

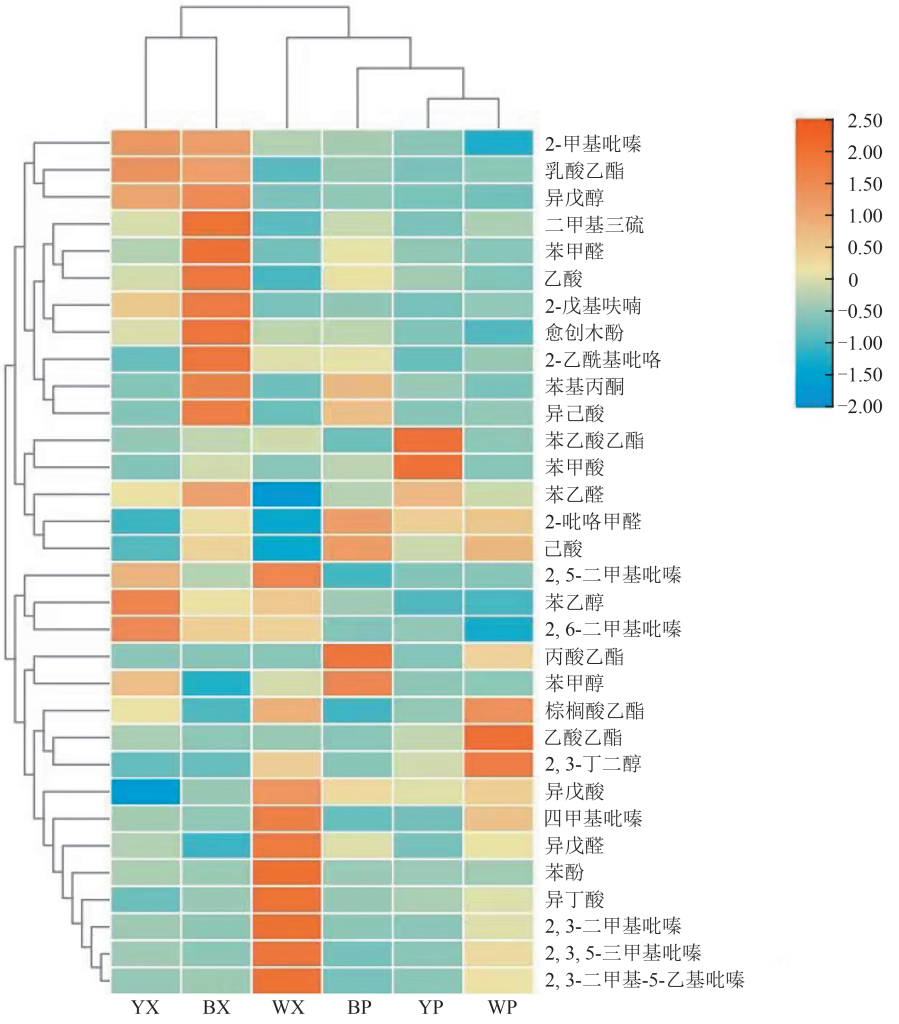
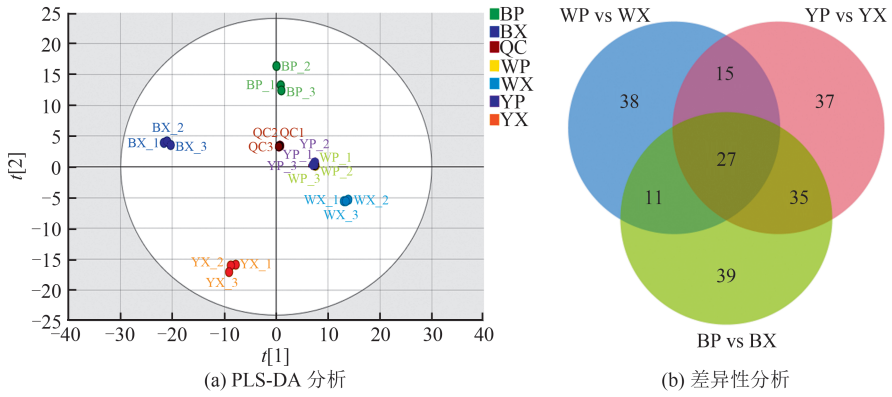


图 8　曲皮、曲心的挥发性物质分析

Fig. 8　Analysis of volatile substances in Qupi and Quxin



(a) PLS-DA 分析　　(b) 差异性分析

图 9　不同类型大曲的 PLS-DA 及差异性分析

Fig. 9　PLS-DA and differential analysis of different types of Daqu

示不同感官特性大曲的曲皮和曲心样品，QC 样本分布紧密，重现性高，系统稳定性高，数据可靠。在 3 种类型大曲中，YP、WP 的组内分散点非常接近，表明 YP 和 WP 的挥发性物质类型相似；YX、BP、BX 这 3 个位置的大曲挥发性物质区别于其他类型大曲，结合酱香型高温大曲的生产过程，发现

黑曲的曲心温度最高可达65 ℃，黄曲的曲心最高温度可达62 ℃。因此，发酵过程温度不同是导致其挥发性物质存在差异的主要原因之一。用韦恩图对不同类型大曲中曲皮、曲心的主要物质进行分析，结果如图9(b)所示。YP vs YX、WP vs WX和BP vs BX中存在27种共有差异性物质，特有差异性物质以BP vs BX最多(39种)，其次是WP vs WX(38种)，YP vs YX最少(37种)。该结果表明，不同类型高温大曲的不同位置样品的挥发性物质数量均存在一定差异。

3 结论

作者利用高通量测序技术联合HS-SPME-GC-MS等技术，解析了3种不同类型大曲中曲皮、曲心的理化指标、微生物多样性及挥发性物质之间的差异性。在理化分析方面，3种大曲的曲皮水分质量分数显著低于曲心(P<0.05)，其中WP的水分质量分数最低，YX水分质量分数最高；曲皮和曲心的酸度大小排序为：BX>YX>BP>WX>YP>WP。

微生物多样性研究结果表明，对细菌而言，Firmicutes、Proteobacteria为大曲的优势细菌门，其中Firmicutes在WX中的相对丰度占比为84.26%，Proteobacteria在YX中的相对丰度占比为96.40%；对真菌而言，Ascomycota为优势真菌门，在BP、BX中的相对丰度占比分别为95.52%、94.80%；在属水平上，BP、BX、YX主要以*Pseudomonas_E*为主要优势细菌属；WP中*Blastococcus*为主要优势细菌属；WX中*Scopulibacillus*为主要优势细菌属。对真菌而言，*Thermomyces*为主要优势真菌属，在所有样品中均检出；WP中*Rhizomucor*为主要优势真菌属。表明大曲不同部位所含的微生物菌群在种类上差异不明显，但其相对丰度占比存在一定差异，且酱香型高温大曲微生物多样性表现为曲皮优于曲心。RDA分析结果表明，WP与水分质量分数和温度呈正相关，YX、BX与酸度呈正相关；从不同类型高温大曲与微生物之间的相关性分析可知，曲皮、曲心的微生态环境差异是导致其微生物群落结构差异的重要原因之一，曲皮、曲心的理化因子差异在一定程度上能够解释曲皮、曲心微生物群落结构的差异。从3种不同类型大曲中曲皮、曲心检出76种挥发性物质，分别为酯类物质、酸类物质、醛类物质、吡嗪类物质、醇类物质、酮类物质、芳香族化合物等。在酯类物质中，乙酸乙酯在WP中的质量分数较高；在醛类物质中，苯甲醛在BX中的质量分数较高；在酸类物质中，异戊酸在WX中的质量分数最高；醇类物质以苯乙醇为主，其在YX中的质量分数较高；吡嗪类化合物在大曲中的质量分数较高，在WX中的质量分数最高。挥发性物质检测结果表明，不同大曲中曲皮、曲心的挥发性物质水平存在一定差异。该研究为优化大曲挥发性物质以及为白酒酿造提供优质高温大曲提供了依据。

参考文献

[1] 王晓丹，雷安亮，班世栋，等. 酱香型大曲细菌的多样性[J]. 食品与发酵工业，2017，43(5)：70-75.
WANG X D，LEI A L，BAN S D，et al. Research on bacterial diversity of Maotai-flavor Daqu[J]. Food and Fermentation Industries，2017，43(5)：70-75.(in Chinese)

[2] ZHANG C L，AO Z H，CHUI W Q，et al. Characterization of the aroma-active compounds in Daqu：a tradition Chinese liquor starter[J]. European Food Research and Technology，2012，234(1)：69-76.

[3] 柳习月，朱琪，杨帆，等. 多组学解析酱香型大曲风味物质的形成[J]. 食品与发酵工业，2021，47(22)：35-41.
LIU X Y，ZHU Q，YANG F，et al. Multi-omics reveal the formation of flavor compounds in sauce-flavor Daqu[J]. Food and Fermentation Industries，2021，47(22)：35-41.(in Chinese)

[4] GAN S H，YANG F，SAHU S K，et al. Deciphering the composition and functional profile of the microbial communities in Chinese Moutai liquor starters [J]. Frontiers in Microbiology，2019，10：1540.

[5] WANG Y R，CAI W C，WANG W P，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.

[6] 王颖，邱勇，王隆，等. 不同产区酱香型高温大曲黑、白、黄曲的理化、挥发性成分差异性分析[J]. 中国调味品，2022，47(6)：155-159.
WANG Y，QIU Y，WANG L，et al. Analysis on the differences of physicochemical indexes and volatile components of black，white and yellow koji at high

temperature with Maotai flavor in different production areas [J]. China Condiment, 2022, 47(6): 155-159. (in Chinese)

[7] 张巧玲，吕锡斌，秦兴，等. 酱香型白酒高温大曲游离氨基酸比较分析[J]. 中国酿造，2019，38(4)：53-57.
ZHANG Q L, LV X B, QIN X, et al. Comparative analysis of free amino acids in high temperature Daqu of Moutai-flavor Baijiu[J]. China Brewing, 2019, 38(4): 53-57. (in Chinese)

[8] 周晨曦，郑福平，李贺贺，等. 白酒大曲风味物质研究进展[J]. 中国酿造，2019，38(5)：6-12.
ZHOU C X, ZHENG F P, LI H H, et al. Research progress on flavor compounds of Baijiu Daqu[J]. China Brewing, 2019, 38(5): 6-12. (in Chinese)

[9] ZHENG X W, TABRIZI M R, ROBERT NOUT M J, et al. Daqu: a traditional Chinese liquor fermentation starter[J]. Journal of the Institute of Brewing, 2011, 117(1): 82-90.

[10] 邓长阳，黎婷玉，刘文汇，等. 襄阳地区中高温大曲曲皮和曲心真菌多样性解析[J]. 中国酿造，2021，40(6)：65-69.
DENG C Y, LI T Y, LIU W H, et al. Fungal diversity in surface and center of medium-high temperature Daqu in Xiangyang area[J]. China Brewing, 2021, 40(6): 65-69. (in Chinese)

[11] 莫祯妮，邱树毅，曾祥勇，等. 基于Illumina Hiseq高通量测序分析酱香型白酒大曲曲皮和曲心的细菌群落差异[J]. 中国酿造，2022，41(2)：48-52.
MO Z N, QIU S Y, ZENG X Y, et al. Difference of bacterial community in different parts of high-temperature Daqu based on Illumina Hiseq high-throughput sequencing [J]. China Brewing, 2022, 41(2): 48-52. (in Chinese)

[12] 高亦豹，王海燕，徐岩. 利用PCR-DGGE未培养技术对中国白酒高温和中温大曲细菌群落结构的分析[J]. 微生物学通报，2010，37(7)：999-1004.
GAO Y B, WANG H Y, XU Y. PCR-DGGE analysis of the bacterial community of Chinese liquor high and medium temperature Daqu [J]. Microbiology China, 2010, 37(7): 999-1004. (in Chinese)

[13] 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.

[14] 谢丹，吴成，毕远林，等. 酱香型白酒高温大曲储存过程中微生物群落演替与理化因子相关性研究[J]. 食品工业科技，2023，44(15)：151-158.
XIE D, WU C, BI Y L, et al. Study on the correlation between microbial community succession and physicochemical factors during the storage of Maotai-flavor liquor in Daqu at high temperature[J]. Science and Technology of Food Industry, 2023, 44(15): 151-158. (in Chinese)

[15] 吴成，程平言，谢丹，等. 酱香型白酒高温大曲发酵过程中真菌多样性研究[J]. 食品与生物技术学报，2023，42(6)：95-103.
WU C, CHENG P Y, XIE D, et al. Investigation on fungal diversity during high-temperature Daqu fermentation of sauce-flavor Baijiu [J]. Journal of Food Science and Biotechnology, 2023, 42(6): 95-103. (in Chinese)

[16] 杨勇，李燕荣，姜雷，等. 中高温大曲曲块部位间生化指标的差异及变化规律[J]. 食品与发酵工业，2019，45(19)：73-78.
YANG Y, LI Y R, JIANG L, et al. Study on the difference and change regulation of biochemical indices between parts of medium and high temperature Daqu[J]. Food and Fermentation Industries, 2019, 45(19): 73-78. (in Chinese)

[17] ZHANG W X, WU Z Y, ZHANG Q S, et al. Combination of newly developed high quality Fuqu with traditional Daqu for Luzhou-flavor liquor brewing [J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2009, 25(10): 1721-1726.

[18] KANG J M, HU Y N, DING Z Y, et al. Deciphering the shifts in microbial community diversity from material pretreatment to saccharification process of Fuyu-flavor Baijiu[J]. Frontiers in Microbiology, 2021, 12: 705967.

[19] 谢丹，吴成，程平言，等. 应用单分子实时测序技术解析酱香型白酒高温大曲制作过程细菌多样性[J]. 食品与发酵工业，2022，48(19)：58-64.
XIE D, WU C, CHENG P Y, et al. Analysis of bacteria diversity during the production of high-temperature Daqu of Maotai-flavor Baijiu using SMRT technology [J]. Food and Fermentation Industries, 2022, 48(19): 58-64. (in Chinese)

[20] 赵驰，苏伟，母应春，等. 不同原料对酱香大曲微生物群落结构及多样性的影响[J]. 食品科学，2022，43(10)：133-141.
ZHAO C, SU W, MU Y C, et al. Effects of different raw materials on microbial community structure and diversity in Jiang-flavor Daqu[J]. Food Science, 2022, 43(10): 133-141. (in Chinese)

[21] FAN G S, FU Z L, TENG C, et al. Comprehensive analysis of different grades of roasted-sesame-like flavored Daqu [J]. International Journal of Food Properties, 2019, 22(1): 1205-1222.

[22] 张倩. 中高温大曲发酵过程中曲皮和曲心微生物群落

结构和功能差异及形成机制[D]. 自贡:四川轻化工大学,2021.

[23] 王欢,席德州,黄永光,等. 酱香型白酒机械化酿造不同轮次堆积发酵细菌菌群结构多样性分析[J]. 食品科学,2020,41(2):188-195.
WANG H, XI D Z, HUANG Y G, et al. Bacterial community structure and diversity in different stacking fermentation rounds in mechanized Maotai-flavor liquor brewing[J]. Food Science, 2020, 41(2): 188-195.(in Chinese)

[24] 左乾程,黄永光,郭敏,等. 酱香型白酒机械化制曲发酵细菌群落的演替[J]. 食品科学,2021,42(18):150-156.
ZUO Q C, HUANG Y G, GUO M, et al. Succession of bacterial community during mechanized fermentation of Maotai-flavor Daqu[J]. Food Science, 2021, 42(18): 150-156.(in Chinese)

[25] 郭润芳,李多川,王荣. 疏绵状嗜热丝孢菌热稳定几丁质酶的纯化及其性质研究[J]. 微生物学报,2005,45(2):267-271.
GUO R F, LI D C, WANG R. Purification and properties of a thermostable chitinase from thermophilic fungus *Thermomyces lanuginosus* [J]. Acta Microbiologica Sinica, 2005, 45(2): 267-271.(in Chinese)

[26] JAIN K K, BHANJA DEY T, KUMAR S, et al. Production of thermostable hydrolases (cellulases and xylanase) from *Thermoascus aurantiacus* RCKK: a potential fungus [J]. Bioprocess and Biosystems Engineering, 2015, 38(4): 787-796.

[27] DENG L, MAO X, LIU D, et al. Comparative analysis of physicochemical properties and microbial composition in high-temperature Daqu with different colors [J]. Frontiers in Microbiology, 2020, 11: 588117.

[28] WANG X S, DU H, ZHANG Y, et al. Environmental microbiota drives microbial succession and metabolic profiles during Chinese liquor fermentation[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2018, 84(4): e02369.

[29] 杨帆,杨玉波,刘延峰,等. 白酒酿造过程中 *Lactobacillus panis* 乳酸合成关键环境因子的鉴定[J]. 食品与生物技术学报,2021,40(1):36-42.
YANG F, YANG Y B, LIU Y F, et al. Identification of key environmental factors of lactic acid biosynthesis by *Lactobacillus panis* for Chinese liquor brewing [J]. Journal of Food Science and Biotechnology, 2021, 40(1): 36-42.(in Chinese)

[30] 蒋容港,黄燕,金友兰,等. 茯砖茶呈香挥发性物质及其来源[J]. 食品与生物技术学报,2021,40(9):101-111.
JIANG R G, HUANG Y, JIN Y L, et al. Study of aroma compounds and their source in Fu brick tea[J]. Journal of Food Science and Biotechnology, 2021, 40(9): 101-111.(in Chinese)

[31] JIN Y, LI D Y, AI M, et al. Correlation between volatile profiles and microbial communities: a metabonomic approach to study Jiang-flavor liquor Daqu [J]. Food Research International, 2019, 121: 422-432.

[32] HUANG X N, FAN Y, LU T, et al. Composition and metabolic functions of the microbiome in fermented grain during light-flavor Baijiu fermentation[J]. Microorganisms, 2020, 8(9): 1281.

[33] FAN G S, DU Y H, FU Z L, et al. Characterisation of physicochemical properties, flavour components and microbial community in Chinese Guojing roasted sesame-like flavour Daqu [J]. Journal of the Institute of Brewing, 2020, 126(1): 105-115.

(责任编辑:闫林红)