DOI:10.12441/spyswjs.20240820002 [文章编号] 1673-1689(2025)09-0100-11

高温大曲与稻草微生物群落结构及差异代谢物研究

谢 丹 吴 成 胡建锋 赵雯宇 黄河鸥 杨军林 毕远林 汪地强*

(贵州习酒股份有限公司,贵州 遵义 564622)

摘要:【目的】解析高温大曲发酵过程中不同环节稻草和高温大曲的微生物群落演替规律、差异代谢物与优势微生物的关系,初步预测高温大曲微生物的来源与贡献度。【方法】采用高通量测序技术联合液相色谱-质谱联用(LC-MS)技术分析高温大曲发酵过程中微生物群落及代谢物的变化规律。【结果】新草(XC)中优势细菌属以 *Pantoea* 和 *Pseudomonas* 为主,优势真菌属以 *Mrakia* 和 *Nigrospora* 为主;母草(MC)中优势细菌属以 *Bacillus* 和 *Saccharopolyspora* 为主。发酵各环节稻草的优势真菌属均以 *Thermomyces* 和 *Aspergillus* 为主,优势细菌属以 *Saccharopolyspora*、*Acinetobacter*、*Bacillus*、*Thermoactinomyces* 为主。LEfSe 差异物种判别分析结果表明,高温大曲和稻草的优势细菌不存在差异显著的物种,真菌共检出 6 种差异物种,*Alfaria* 和 *Myriococcum* 是稻草中的代表性真菌,*Pichia*、*Saccharomyces*、*Monascus* 和 *Kodamaea* 是高温大曲中的代表性真菌。同时,基于 Source Tracker 溯源分析可知,不同环节稻草对高温大曲的细菌贡献度极低,而对高温大曲的真菌贡献度存在差异,其中,二次翻曲稻草(EFC)对拆曲大曲(CQQ)的真菌贡献度最高。通过对代谢物进行分析,稻草和高温大曲间共筛选出 197 种差异代谢物,且差异代谢物与优势微生物之间的关联关系构成了发酵过程的基本生物学调控机制。【结论】该研究为后续高温大曲发酵机理研究及提高传统发酵过程的可控性奠定了基础。

关键词:高温大曲;稻草;微生物多样性;溯源分析;差异代谢物

Microbial Community Structure and Differential Metabolites of High-temperature Daqu and Rice Straw

XIE Dan WU Cheng HU Jianfeng ZHAO Wenyu HUANG Heou
*YANG Junlin BI Yuanlin WANG Diqiang**

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

Abstract: [**Objective**] This study was designed to elucidate the microbial community succession dynamics of rice straw and high-temperature Daqu at distinct stages of fermentation, investigate the associations between differential metabolites and dominant microorganisms, and preliminarily predict the sources and contribution of microorganisms in high-temperature Daqu. [**Method**] High-throughput sequencing combined with liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS) was used to analyze the variation patterns of microbial communities and metabolites during the fermentation of high-temperature Daqu. [**Result**] *Pantoea* and *Pseudomonas* were the dominant bacterial genera, while the dominant fungal genera were *Mrakia* and *Nigrospora* in new rice straw (XC). For mother rice straw (MC), *Bacillus* and *Saccharopolyspora* were identified as the dominant bacterial genera. At various fermentation stages, the dominant fungal genera were *Thermomyces*

基金项目:贵州省科技计划项目(黔科合支撑[2023]一般 342,黔科合支撑[2023]一般 341,黔科合成果[2023]一般 145)。
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:2024-08-20 **修回日期:**2024-10-11

and *Aspergillus*, whereas the dominant bacterial genera were *Saccharopolyspora*, *Acinetobacter*, *Bacillus*, and *Thermoactinomyces*. LEfSe revealed no significant differences in the dominant bacterial taxa between high-temperature Daqu and rice straw. In contrast, a total of six differential fungal taxa were collectively identified through co-analysis. Among them, *Alfaria* and *Myriococcum* were recognized as the marker fungal specific to rice straw, while *Pichia*、 *Saccharomyces*、 *Monascus*, and *Kodamaea* were the representative marker fungal in high-temperature Daqu. Source Tracker-based source tracking analysis indicated that the bacterial contribution of rice straw to high-temperature Daqu was negligible across different stages, whereas the fungal contribution varied among stages. Notably, the second-turn rice straw (EFC) exerted the highest fungal contribution to the detached Daqu (CQQ). Metabolomic profiling revealed 197 differential metabolites between rice straw and high-temperature Daqu. The correlation network between these differential metabolites and dominant microorganisms underpinned the fundamental biological regulatory mechanisms governing the fermentation process. [**Conclusion**] This study establishes a foundation for subsequent investigations into the fermentation mechanism of high-temperature Daqu and for enhancing the controllability of traditional fermentation processes.

Keywords: high-temperature Daqu; rice straw; microbial diversity; source tracking analysis; differential metabolite

酒曲制作在中国已有2 000多年的历史，按品温可将其分为高温大曲（60~65 ℃）、中温大曲（50~60 ℃）和低温大曲（40~50 ℃）[1]。高温大曲以小麦为主要原料，是酱香型白酒酿造过程中的唯一糖化发酵剂，具有提供菌源、糖化发酵、生香等作用[2]。在酱香型白酒高温大曲发酵过程中，稻草是必不可少的辅料之一，具有隔离、保温、吸潮以及接种微生物等作用，亦是高温大曲发酵过程中重要的微生物来源，对曲胚的成型和发酵具有重要意义[3-4]。

近年来，已有相关研究报道了关于高温大曲与稻草微生物群落结构组成。高温大曲发酵过程中，*Bacillus*、*Lactobacillus*、*Weissella*、*Thermoactinomyces*是主要的优势细菌属，*Thermomyces*、*Aspergillus*、*Saccharomyces*是主要的优势真菌属[5-6]。张原頔等[7]采用传统可培养法和高通量测序技术对比分析了高温大曲中使用的新、老稻草的微生物组成，结果表明，新稻草中的主要优势细菌属为*Pantoea*，而老稻草中的为*Bacillus*和*Saccharopolyspora*，与高温大曲优势细菌属相似，且老稻草中的菌落总数、真菌等的数量均显著高于新稻草（P<0.05）。研究表明，在实际生产的安曲过程中，增加老稻草的投入量有利于大曲品质的提升[8]。此外，高温大曲生产工艺的复杂性以及制曲过程的开放性，为其提供了丰富的微生物来源。Du等[9]利用微生物溯源来分析高温大曲微生物的来源，结果表明，原料小麦是高温大曲中细菌的主要来源，而真菌大多来源于制曲环境，这与Wang等[10]的研究结果一致。然而，高温大曲与稻草微生物菌群以及挥发性风味物质之间的关联作用仍有待进一步探究。

基于此，该研究以关键工序环节（安曲、一次翻曲、二次翻曲、拆曲）的高温大曲以及对应环节使用的不同类别稻草为研究对象，采用高通量测序技术解析微生物群落结构组成和演替规律，溯源分析高温大曲与稻草微生物群落，采用LC-MS分析高温大曲与稻草之间的差异代谢物，以期为进一步阐明高温大曲发酵机理、优化稻草使用效率提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

聚合酶链式反应引物：翌圣生物科技（上海）股份有限公司；E.Z.N.A™ Mag-Bind Soil DNA Kit试剂盒：美国OMEGA BioTek公司；Qubit dsDNA HS分析试剂盒：美国赛默飞世尔科技公司。

1.2 仪器与设备

超高效液相系统：Thermo Vanquish型，美国赛默飞世尔科技公司；质谱仪：Thermo Q Exactive Focus型，美国赛默飞世尔科技公司；自动蒸汽灭菌器：KG-AP32L型，日本ALP公司；旋涡混合器：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，深圳拓能达科技有限公司；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；冷冻离心机：H1850-R型，湖南湘仪实验室仪器开发有限公司；组织研磨器：MB-96型，浙江美壁仪器有限公司。

1.3 方法

1.3.1 样品采集

高温大曲、稻草样品均采集自作者所在单位的制曲车间。大曲经高温堆积发酵结束后，按照发酵仓不同发酵位置（靠门、中心、靠窗）采集高温大曲和稻草样品，见图1。高温大曲样品包括：安曲曲胚（AQQ），曲胚经压制成型后进入发酵房时的高温大曲；一次翻曲大曲（YFQ），曲胚在发酵房经7 d发酵的高温大曲；二次翻曲大曲（EFQ），曲胚在发酵房经14 d发酵的高温大曲；CQQ，曲胚在发酵房经40 d发酵的高温大曲。稻草样品包括：XC，新购置进生产车间厂房还未使用的稻草；MC，在发酵房与高温大曲经40 d发酵筛选出来的无腐烂、无发霉且起到接种作用的稻草；安曲稻草（AQC），曲胚在进入发酵房后，将部分XC和MC混合后，用于隔离曲胚；一次翻曲稻草（YFC），稻草和曲胚同时经7 d发酵后，进行一次翻曲时采集的稻草；EFC，稻草和曲胚经14 d发酵后，进行第二次翻曲时采集的稻草；拆曲稻草（CQC），稻草和曲胚经40 d发酵后，将稻草和曲胚移出发酵仓时采集的稻草。每份样品采集3份，共计采集样品30份，将每3份样品综合成1个样品，共计10个综合样品。将采集的10个综合样品置于无菌密封取样袋中，于−4 ℃保存，带回实验室进行检测分析。

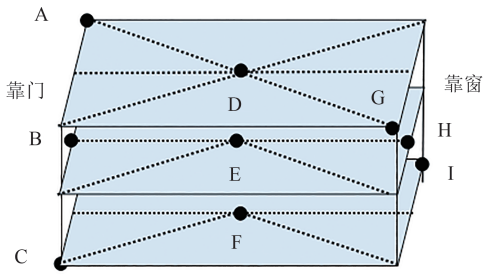


图1 发酵房内高温大曲取样位置示意图

Fig. 1 Schematic diagram of sampling location for high-temperature Daqu in the fermentation room

1.3.2 高温大曲总DNA的提取及扩增

样品总DNA提取方法及PCR扩增条件参照谢丹等[11]的方法。

1.3.3 高通量测序

对细菌16S rRNA基因全长、真菌ITS1—ITS2区进行高通量测序分析，由生工生物工程（上海）股份有限公司进行上机分析。基于97%相似水平的操作分类单元（operational taxonomic units，OTU）代表序列，分别使用UNITE和Silva为参考数据库进行细菌和真菌物种注释分析，使用QIIME软件计算样品Chao1指数、Shannon指数和Simpson指数。

1.3.4 代谢物分析

准确称量0.5 g样品于2 mL离心管中，加入600 μL含2-氯-*L*-苯丙氨酸（4 μg/g）的甲醇溶液，涡旋振荡30 s后，加入钢珠，放入组织研磨器中，55 Hz研磨60 s，然后室温超声15 min，于12 000 r/min、4 ℃离心10 min，取上清液经0.22 μm膜过滤，将滤液置于检测瓶中用于LC-MS检测。色谱条件和质谱条件参照Zelena等[12]、韩晓云等[13]和Want等[14]的方法，以2-氯-*L*-苯丙氨酸为内标物，采用面积归一化法对各代谢物进行半定量分析。

1.4 数据分析

用联川生物云平台（https://www.omicstudio.cn/tool/124）绘制物种丰度柱状图、UpSet韦恩图、LEfSe差异物种分析、相关性热图及火山图；用SIMCA软件进行正交-偏最小二乘判别分析（OPLS-DA）。用*R*语言Source Tracker对发酵过程中的高温大曲及不同发酵环节稻草的微生物群落来源进行预测。

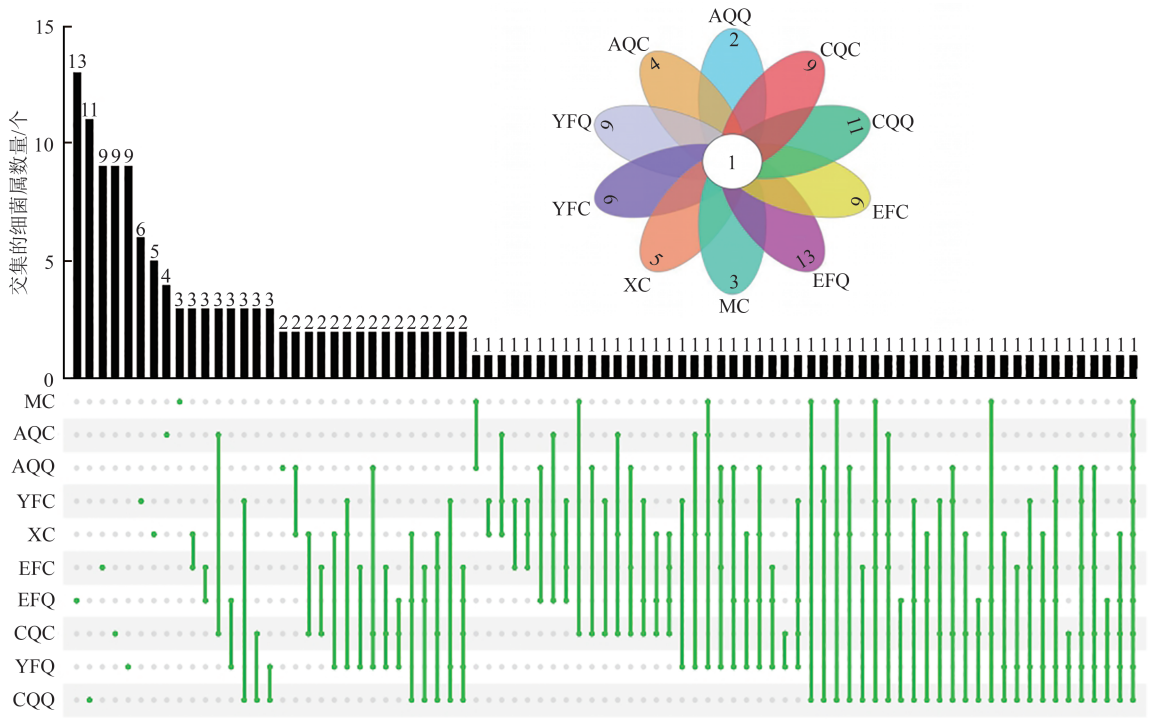
2 结果与讨论

2.1 高通量测序数据质量评价

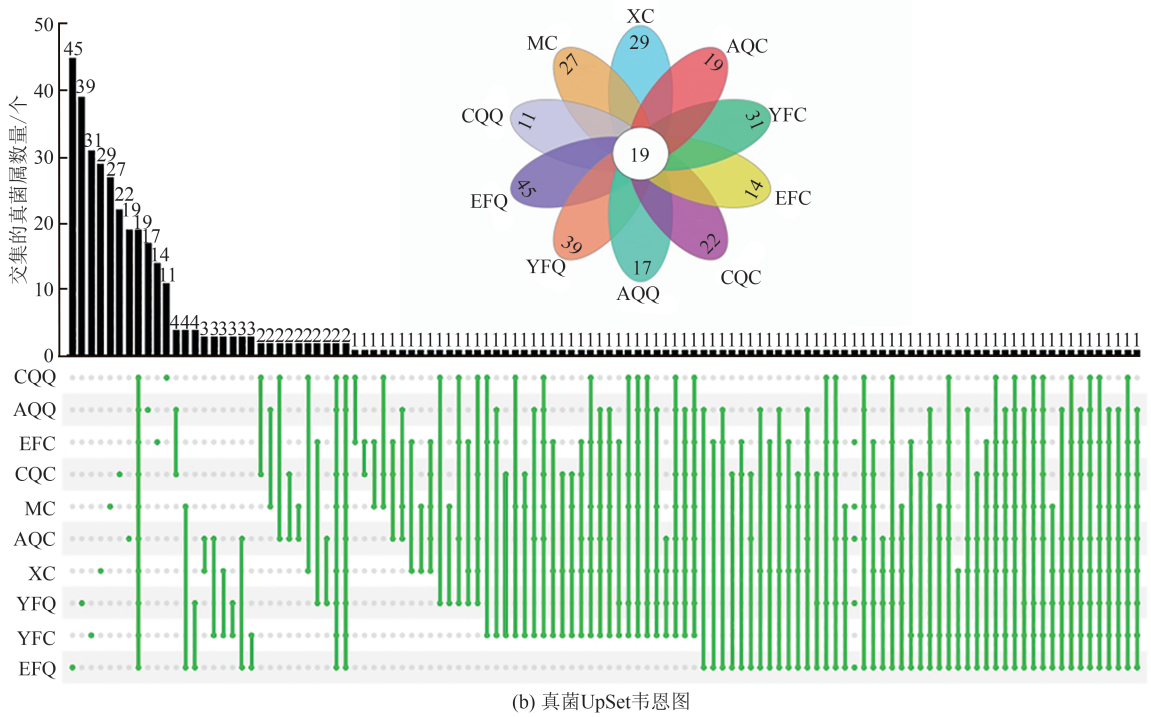
高温大曲和稻草样品经高通量测序后，得到的细菌和真菌原始序列分别为57 696条和1 315 133条，经去除引物接头序列、拼接识别、过滤等处理后，得到的有效序列分别为56 378条和1 288 129条，平均长度分别为1 514 bp和251 bp。在97%相似水平下对得到的有效序列进行OTU划分，细菌和真菌多样性分别为419个和925个OTU，高温大曲和稻草中共有的细菌和真菌OTU分别为1个和19个，见图2。表明高温大曲和稻草中细菌群落组成差异较大。

2.2 α多样性指数分析

α多样性指数主要包括Shannon指数、Simpson指数和Chao1指数，Shannon指数和



(a) 细菌UpSet韦恩图



(b) 真菌UpSet韦恩图

图 2　高温大曲和稻草 OTU 韦恩图

Fig. 2　Venn diagrams of OTU in high-temperature Daqu and rice straw

Simpson 指数可用于衡量样品中的物种多样性，Chao1 指数可用于衡量样品中的物种总数[15]。由表 1 可知，高温大曲和稻草从安曲到拆曲环节，细菌的 Shannon 指数和 Chao1 指数呈升高趋势，Simpson 指数呈降低趋势，表明高温大曲和稻草的细菌多样性越来越丰富。但随着发酵的进行，由于 MC 中的优势物种占比较高，其 Chao1 指数反而降低。而高温大曲和稻草中真菌多样性呈先增加后降低的趋势，高温大曲在一次翻曲和二次翻曲环节，真菌多样性最为丰富，Shannon 指数

分别为3.22、3.34。有研究表明，在高温大曲发酵过程中，多数的真菌微生物易受到发酵仓内高温环境的调控[16]。稻草在一次翻曲环节，真菌多样性最为丰富，Shannon指数为2.52，且在安曲和拆曲环节，高温大曲和稻草真菌Chao1指数均较高，表明虽然在安曲和拆曲2个环节中高温大曲和稻草真菌多样性较低，但真菌物种总数较多。此外，XC的细菌和真菌多样性高于MC，但MC真菌Chao1指数高于XC，表明MC中真菌物种总数较多。张原崛等[7]研究表明，MC附着了丰富的制曲培菌过程产生的微生物，尤其是耐热的细菌和真菌，从而造成MC中菌落总数和真菌等的数量显著高于XC。覆盖率可以反映测序结果的真实情况，所有样品覆盖率都达到100.00%，表明测序结果可真实反映样品中微生物群落结构的组成情况。

表1 α多样性指数分析

Table 1 α-Diversity index analysis

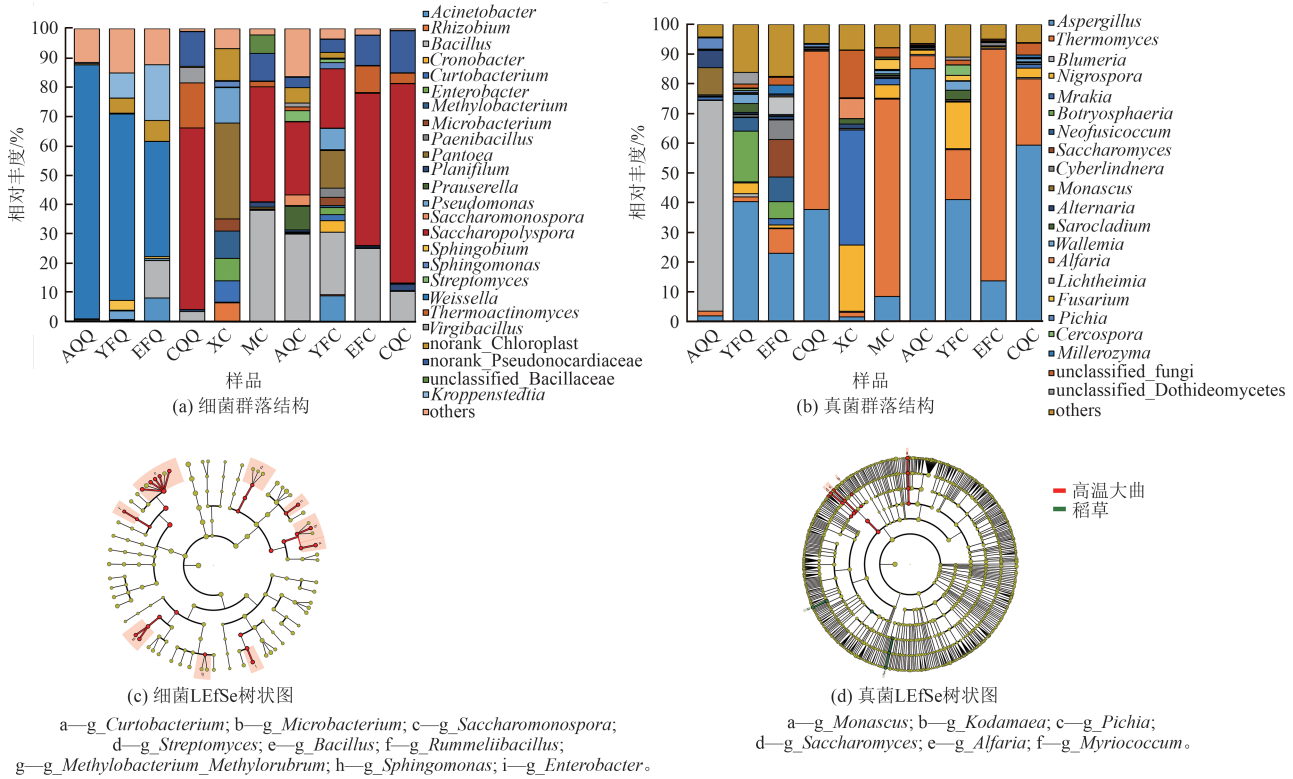
样品编号	细菌多样性				真菌多样性			
	Shannon指数	Simpson指数	Chao1指数	覆盖率/%	Shannon指数	Simpson指数	Chao1指数	覆盖率/%
AQQ	2.93	0.06	22.00	100.00	1.85	0.33	445.51	100.00
YFQ	3.93	0.02	58.00	100.00	3.22	0.08	263.67	100.00
EFQ	3.81	0.03	56.00	100.00	3.34	0.07	209.00	100.00
CQQ	3.81	0.04	67.00	100.00	1.26	0.42	439.19	100.00
XC	3.63	0.03	48.00	100.00	2.18	0.23	506.05	100.00
MC	2.13	0.15	11.00	100.00	1.76	0.45	575.23	100.00
AQC	2.29	0.13	15.00	100.00	1.51	0.42	536.12	100.00
YFC	3.33	0.04	36.00	100.00	2.52	0.18	555.24	100.00
EFC	3.59	0.04	49.00	100.00	1.09	0.62	528.32	100.00
CQC	3.81	0.03	57.00	100.00	1.96	0.28	554.59	100.00

2.3 发酵过程高温大曲和稻草微生物群落结构及其演替规律

由图3(a)可知，对于细菌多样性而言，AQQ、YFQ和EFQ中优势群落组成较为一致，其中AQQ以*Weissella*为主，YFQ和EFQ以*Weissella*和*Kroppenstedtia*为优势细菌属，这3个样品中*Weissella*、*Kroppenstedtia*的相对丰度分别为39.38%~86.73%和0.40%~19.01%。CQQ中优势细菌属为*Saccharopolyspora*和*Thermoactinomyces*，相对丰度分别为62.02%、15.35%。XC中优势细菌属以*Pantoea*和*Pseudomonas*为主，相对丰度分别为32.76%、12.08%，这与张原崛等[7]的研究结果一致。*Pantoea*、*Pseudomonas*是水稻、玉米、大麦等植物的优势内生菌群[17-19]，具有促进植物生长、生物固氮、增加宿主植物抗病能力等作用。任婷月等[20]研究表明，不同品种的大麦可能由于其内生菌群的多样性对清香型白酒制曲有一定影响。而MC中优势细菌属为*Saccharopolyspora*和*Bacillus*，相对丰度分别为39.27%、37.97%，它们也是高温大曲中的优势细菌属[21]。相关研究表明，*Saccharopolyspora*对酿造微生态中细菌群落的稳定性具有重要作用[22]，*Bacillus*可代谢生成多种水解酶，以及各种风味物质及其前体化合物[23]。norank_Pseudonocardiaceae在MC中的相对丰度(9.45%)也较高，隶属于放线菌门，主要与纤维素降解以及一些重要的生物酶和微生物合成有关[24]。从曲胚进入发酵房开始，发酵环节稻草优势细菌属以*Saccharopolyspora*、*Acinetobacter*、*Bacillus*、*Thermoactinomyces*为主。从安曲到拆曲环节，稻草中*Saccharopolyspora*相对丰度逐渐升高，成为最主要的细菌属，而*Bacillus*相对丰度逐渐降低，CQC中*Saccharopolyspora*、*Bacillus*的相对丰度分别为68.06%、10.26%；且在AQC和YFC中，还检出了一定数量的*Pantoea*、*Pseudomonas*、*Acinetobacter*。

由图3(b)可知，对于真菌多样性而言，AQQ中优势真菌属为*Blumeria*(71.08%)、*Monascus*(9.12%)、*Alternaria*(5.85%)和*Pichia*(3.79%)，这与吴成等[25]的研究结果部分一致。其中，*Blumeria*在安曲环节相对丰度较高，其可能来源于原料。随着堆积发酵的进行，*Aspergillus*、

Thermomyces 等成为高温大曲中的主要优势真菌属，到拆曲环节，其相对丰度分别达 37.56% 和 53.42%。XC 中优势真菌属组成与其他稻草样品差异较大，以 *Mrakia*（38.80%）为主，其次为 *Nigrospora*（22.33%）。*Nigrospora* 是重要的植物内生真菌之一，在自然界中分布广泛[26-27]。发酵环节稻草的优势真菌属以 *Thermomyces* 和 *Aspergillus* 为主，其中 *Thermomyces* 是 YFC 和 EFC 的优势真菌属，相对丰度分别为 16.84%、78.15%；*Aspergillus* 在 AQC 中的相对丰度最高（85.07%），其次是 CQC（59.27%）。其他发酵阶段稻草与高温大曲的真菌群落结构相似，但存在一定程度的菌群交互作用。高温大曲从安曲到拆曲环节，由于堆积温度持续升高，*Aspergillus* 的相对丰度在 YFQ（40.21%）和 CQQ（37.56%）中较高，而 *Thermomyces* 相对丰度逐渐上升，与稻草中优势细菌群落具有相似的演替规律，表明堆积温度不仅对高温大曲中的微生物具有调控作用[28]，同时对稻草中的优势细菌属具有筛选效应，即未经过高温堆积的稻草中优势细菌属与 XC 类似，而经过高温堆积发酵有利于 MC 中优势微生物的构建。进一步采用 LEfSe 对不同发酵阶段高温大曲和稻草进行差异物种判别分析，结果见图 3（c）~（d）。高温大曲和稻草的优势细菌不存在差异显著的物种，差异主要体现在优势真菌群落组成上，*Pichia*、*Saccharomyces*、*Monascus* 和 *Kodamaea* 是高温大曲的代表性真菌属，*Alfaria* 和 *Myriococcum* 是稻草的代表性真菌属。



(a) 细菌群落结构　(b) 真菌群落结构

(c) 细菌LEfSe树状图

a—g_*Curtobacterium*; b—g_*Microbacterium*; c—g_*Saccharomonospora*; d—g_*Streptomyces*; e—g_*Bacillus*; f—g_*Rummeliibacillus*; g—g_*Methylobacterium_Methylorubrum*; h—g_*Sphingomonas*; i—g_*Enterobacter*。

(d) 真菌LEfSe树状图

a—g_*Monascus*; b—g_*Kodamaea*; c—g_*Pichia*; d—g_*Saccharomyces*; e—g_*Alfaria*; f—g_*Myriococcum*。

图 3　属水平上优势微生物群落结构及差异微生物分析

Fig. 3　Genus-level community structure and differential microorganisms

2.4　高温大曲微生物溯源分析

2.4.1　高温大曲及稻草微生物聚类分析

如图 4（a）所示，根据样品类型的不同，AQQ、YFQ、EFQ 中的细菌群落聚成一类，MC、EFC、CQC、CQQ 中的细菌群落聚成一类，细菌群落聚成一类的样品表明其细菌相似度较大。如图 4（b）所示，AQC 和 YFQ 的真菌群落聚成一类，说明其真菌相似度较大；YFC、EFQ 和 CQC 的真菌群落聚成一类，说明这 3 个样品的真菌相似度较大；MC 和 EFC 的真菌群落单独聚成一类，说明了这 2 个样品的真菌相似度较大；其他样品之间的真菌群落聚集性不高，说明其真菌群落存在差异。

2.4.2　稻草微生物对高温大曲微生物的贡献

采用贝叶斯概率工具 Source Tracke[29] 分析发

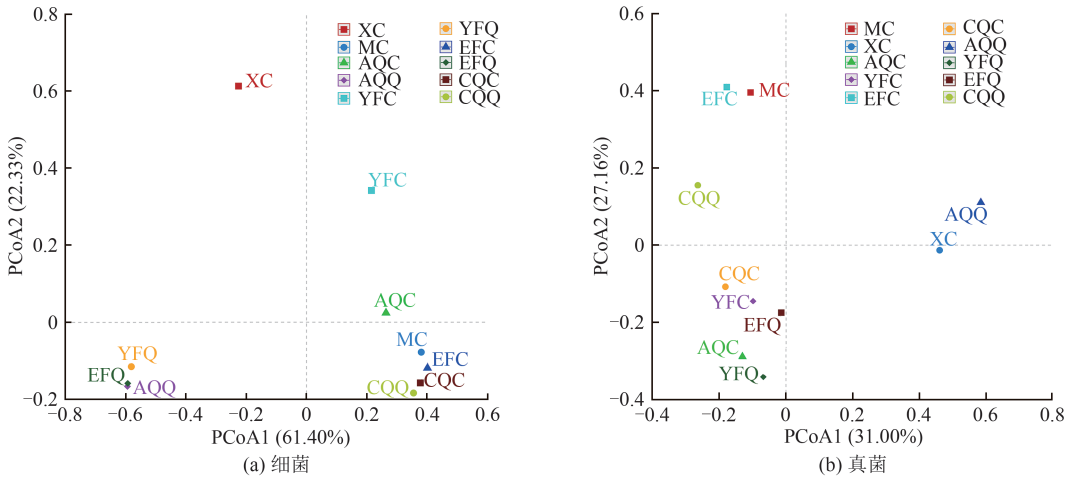


图 4　高温大曲和稻草样品中微生物群落聚类分析

Fig. 4　Cluster analysis of microbial communities in high-temperature Daqu and rice straw samples

酵过程中稻草、高温大曲微生物的来源和贡献度，将不同环节高温大曲设置为被溯源对象、不同环节稻草设置为微生物来源，进行溯源分析。由图 5 可知，YFQ、EFQ、CQQ 中的真菌来源具有相似性；AQQ 中的真菌溯源到稻草里面的比例较少，基本为未知真菌贡献，这可能是由于高温大曲制曲过程的开放性，导致安曲环节的微生物来源较为广泛，因此仅溯源到稻草中还远远不够，需要集采大量的样品进行下一步分析。YFQ 中，未知真菌贡献度为 71.90%，YFC、AQC、CQC 的真菌贡献度分别为 14.08%、6.14%、4.75%；EFQ 中，未知真菌贡献度为 65.83%，AQC 和 CQC 的真菌贡献度分别为 7.38%、11.74%。CQQ 中，EFC、CQC、AQC 的真菌贡献度分别为 50.41%、18.97%、16.87%，MC 真菌贡献度为 10.11%。从真菌溯源结果来看，稻草是高温大曲发酵过程中不可缺少的一部分，两者之间的真菌菌群结构相互作用，从曲胚入房发酵开始，高温大曲中的真菌来源逐渐趋于稳定，这是微生物菌种选择和富集的过程，从未知来源转变为已知来源，使发酵朝着有利的方向进行。在高温大曲中的细菌溯源方面，除了 CQC 在 CQQ 中的细菌贡献度为 72.73%，发酵各环节的稻草对 AQQ、YFQ、EFQ 的细菌贡献度均极低。相关研究表明，发酵开始时高温大曲中 89.3% 的细菌来自原料小麦[30]，且原料小麦是发酵开始时高温大曲中糖多孢菌属、葡萄球菌属、拟诺卡氏菌属、短杆菌属等的主要来源，这些菌群也是原料中的主要内生菌群[31]。制曲原料是发酵开始时高温大曲中细菌的主要来源[32]，而制曲环境中的细菌的贡献度较小。

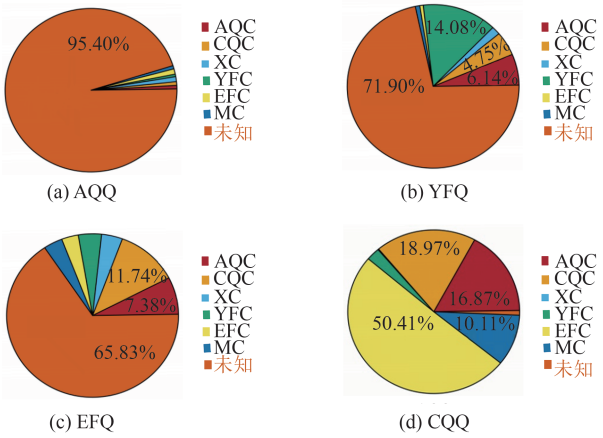


图 5　不同环节稻草和高温大曲真菌群落溯源分析

Fig. 5　Source tracking analysis of fungal communities in rice straw and high-temperature Daqu at different stages

2.5　高温大曲和稻草代谢物组成及其差异分析

采用 OPLS-DA 分析高温大曲和稻草中代谢物差异，该方法可在不降低模型预测能力的前提下，有效减少模型的复杂性和增强模型的解释能力，从而最大程度展示组间差异。高温大曲和稻草的 OPLS-DA 得分见图 6(a)。稻草主要分布在置信区间左侧，高温大曲主要分布在置信区间右侧，说明该模型能够对高温大曲和稻草进行有效区分，进一步说明了 2 种样品之间的代谢物存在差异。此外，该模型的交叉验证参数 R_X^2、R_Y^2 和 Q^2 分别为 0.545、1.000 和 0.997，这 3 个参数均大于 0.5，说明模型的可解释度和可预测性良好，因此该研究建立的 OPLS-DA 模型能够有效分析高温大曲和

稻草之间的代谢差异。对OPLS-DA模型进行验证，结果如图6(b)所示，R^2和Q^2的回归线均呈向上趋势，表明位移试验通过，模型没有过拟合。

根据OPLS-DA模型分析结果，将t检验的P(≤0.05)和预测变量重要度(VIP)值(≥1)作为代谢物的筛选标准，来筛选高温大曲和稻草之间差异显著的代谢物。高温大曲和稻草中共得到197种差异代谢物，包括13种苯酚类、29种醇类、28种酯类、27种烷烃类、44种醛酮类、13种呋喃类、5种吡嗪类、5种酸类和33种其他类物质。由图6(c)可知，显著上调的差异代谢物数量为79种，显著下调的差异代谢物数量为113种。

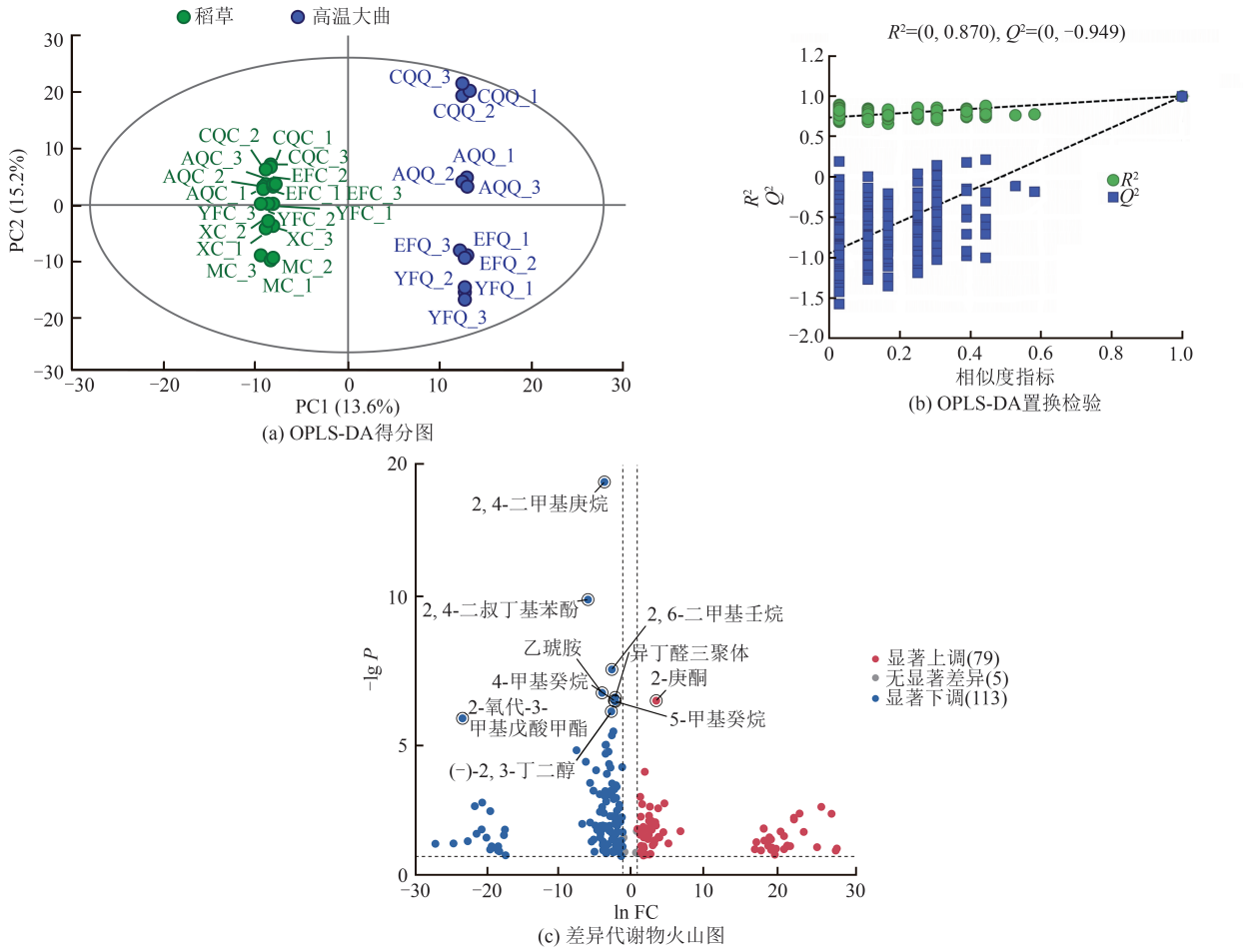
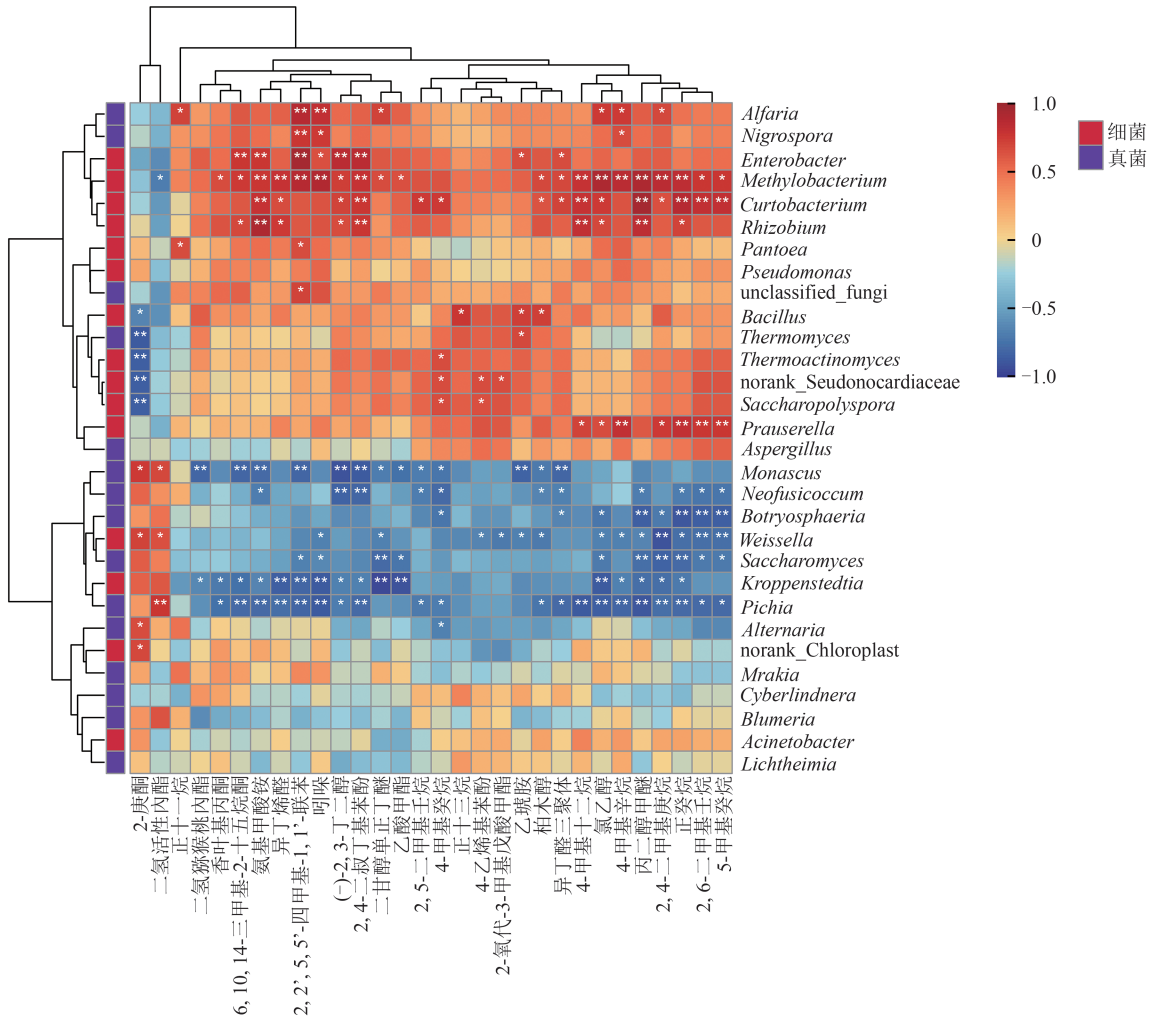


图6　不同环节稻草和高温大曲差异代谢物分析

Fig. 6　Analysis of differential metabolites in rice straw and high-temperature Daqu at different stages

2.6　高温大曲和稻草优势微生物与相关性分析

根据以上研究结果，高温大曲和稻草中的微生物种类存在显著差异，这种差异直接导致了它们代谢物的不同。高温大曲中的微生物以霉菌、酵母和细菌为主，这些微生物通过复杂的代谢途径产生多种风味物质；而稻草的微生物则主要以能够降解纤维素的微生物为主，它们产生的代谢物主要为有机酸及其他降解产物。为探究不同发酵阶段高温大曲和稻草差异代谢物与优势微生物之间的相关性，分别选取VIP值>1的前30种差异代谢物及真菌、细菌相对丰度排名前15的优势微生物进行相关性分析，见图7。于细菌而言，*Bacillus*与乙琥胺、柏木醇、正十三烷呈显著正相关，与2-庚酮呈显著负相关；*Weissella*与2-庚酮、二氢活性内酯呈显著正相关，与正癸烷、丙二醇甲醚、4-甲基辛烷、氯乙醇、乙琥胺、柏木醇等多种代谢物呈显著负相关，与5-甲基癸烷、2,6-二甲基壬烷、2,4-二甲基庚烷呈极显著负相关；*Methylobacterium*与(−)-2,3-丁二醇、5-甲基癸烷、乙酸甲酯等多种代谢物呈显著正相关，与正癸烷、2,4-二甲基庚烷、丙二醇甲醚、4-甲基辛烷、氯乙醇



*—P<0.05，显著相关；**—P<0.01，极显著相关。

图 7　差异性代谢物与优势微生物之间的相关性分析

Fig. 7　Correlations between differential metabolites and dominant microorganisms

等多种代谢物呈极显著正相关。于真菌而言，*Saccharomyces* 与正癸烷、2，4-二甲基庚烷、丙二醇甲醚、二甘醇单正丁醚呈极显著负相关；*Thermomyces* 与乙琥胺呈显著正相关，与 2-庚酮呈极显著负相关。此外，细菌与差异代谢物之间大多呈正相关，真菌与差异代谢物之间大多呈负相关。差异代谢物与优势微生物之间的关联关系构成了发酵过程的基本生物学调控机制，这也是发酵过程中发酵动力、风味动力的形成以及调控机制的基本组成[33]。高温大曲和稻草中的微生物与代谢物之间的相互作用促进了独特风味的形成。高温大曲中的微生物通过代谢作用产生多种风味物质，这些物质共同构成了白酒的复杂风味；而稻草微生物降解产生的有机酸及其他降解产物，为稻草的后续资源化利用提供了可行性。

3　结论

该研究深入剖析了高温大曲发酵周期内，不同发酵环节高温大曲和稻草的微生物群落动态变化，初步预测了高温大曲中微生物的来源与贡献度。同时，分析了发酵过程中的差异代谢物，并探讨了优势微生物与这些代谢物之间的内在联系。结果显示，稻草细菌多样性高于高温大曲，且各环节优势菌群存在显著差异，其中 XC 以 *Pantoea* 和 *Pseudomonas* 为主要优势细菌属，MC 以 *Bacillus* 和 *Saccharopolyspora* 为优势细菌属。从曲胚进入发酵房开始，发酵环节稻草优势细菌属以 *Saccharopolyspora*、*Acinetobacter*、*Bacillus* 和 *Thermoactinomyces* 为主。真菌多样性方面，XC 显著区别于其他环节的稻草，其优势真菌属主要为

*Mrakia*和*Nigrospora*。其他发酵阶段稻草与高温大曲的真菌群落结构相似，但存在一定程度的菌群交互作用。LEfSe分析进一步确认了高温大曲与稻草的优势细菌不存在差异显著的物种，但在真菌方面，共识别出6种差异真菌，包括稻草中的代表性真菌*Alfaria*和*Myriococcum*，及高温大曲中的代表性真菌属*Pichia*、*Saccharomyces*、*Monascus*和*Kodamaea*。Source Tracker溯源分析量化了不同稻草对高温大曲真菌和细菌的贡献度，在CQQ中，EFC的真菌贡献度最高，为50.41%，其他环节稻草对真菌均有不同程度的贡献度；CQC的细菌贡献度为72.73%，而其他环节稻草的细菌贡献度均极低。此外，差异代谢物分析结果表明，高温大曲和稻草中共有197种差异代谢物，包括苯酚类、醇类、酯类、烷烃类、醛酮类、呋喃类、吡嗪类、酸类及其他类物质，这些差异代谢物与优势微生物的相互作用共同构建了发酵过程的核心生物学调控网络，对发酵动力及风味特征的形成与调控至关重要。该研究不仅深化了对高温大曲发酵机制的理解，也为提升传统发酵工艺的可控性及优化其工艺流程提供了理论基础与数据支持。

参考文献

[1] 刘雄. 中、高温大曲固态发酵过程微生物菌群结构变化的研究[D]. 广州：华南理工大学，2017.

[2] 卓毓崇，王会，赵荣寿，等. 高温大曲培菌方法的探讨[J]. 酿酒科技，2014(7)：69-71.
ZHUO Y C，WANG H，ZHAO R S，et al. Investigation on bacteria culture for high-temperature Daqu[J]. Liquor-Making Science & Technology，2014(7)：69-71.(in Chinese)

[3] 吴煜樟，郭敏杰，高宇. 酱香型白酒大曲生产使用稻草的研究进展[J]. 食品科技，2023，48(6)：62-66.
WU Y Z，GUO M J，GAO Y. Research progress of straw used in production of Jiang-flavour Baijiu Daqu[J]. Food Science and Technology，2023，48(6)：62-66.(in Chinese)

[4] 罗小叶，邱树毅，陆安谋，等. 酱香大曲产香酵母的分离及鉴定[J]. 食品与发酵工业，2016，42(12)：26-31.
LUO X Y，QIU S Y，LU A M，et al. Isolation and identification of aroma-producing yeast in Moutai-flavor Daqu[J]. Food and Fermentation Industries，2016，42(12)：26-31.(in Chinese)

[5] 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.

[6] 黄瑜. 制曲原辅料微生物组成对酱香型白酒风味的影响[D]. 无锡：江南大学，2021.

[7] 张原頓，沈毅，程伟，等. 三代全长高通量测序分析新稻草和陈稻草的微生物特征[J]. 中国酿造，2022，41(9)：24-30.
ZHANG Y D，SHEN Y，CHENG W，et al. Microbiota characteristics of new straw and used straw based on third-generation full-length high-throughput sequencing[J]. China Brewing，2022，41(9)：24-30.(in Chinese)

[8] 王西，陈波，张亚东，等. 高温大曲安曲投入老草的应用研究[J]. 酿酒科技，2020(12)：88-91.
WANG X，CHEN B，ZHANG Y D，et al. Application of used straw in the cultivation of high-temperature Daqu[J]. Liquor-Making Science & Technology，2020(12)：88-91.(in Chinese)

[9] DU H，WANG X S，ZHANG Y H，et al. Exploring the impacts of raw materials and environments on the microbiota in Chinese Daqu starter[J]. International Journal of Food Microbiology，2019，297：32-40.

[10] WANG Q，ZHANG H X，LIU X. Microbial community composition associated with Maotai liquor fermentation[J]. Journal of Food Science，2016，81(6)：M1485-M1494.

[11] 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)

[12] ZELENA E，DUNN W B，BROADHURST D，et al. Development of a robust and repeatable UPLC-MS method for the long-term metabolomic study of human serum[J]. Analytical Chemistry，2009，81(4)：1357-1364.

[13] 韩晓云，陶雨婷，战佳莹，等. 桑葚发酵前后酚类组成变化及其抗氧化活性分析[J]. 食品工业科技，2024，45(2)：280-288.
HAN X Y，TAO Y T，ZHAN J Y，et al. Analysis of phenolic composition changes and antioxidant activity of mulberry before and after fermentation[J]. Science and Technology of Food Industry，2024，45(2)：280-288.(in Chinese)

[14] WANT E J，MASSON P，MICHOPOULOS F，et al. Global metabolic profiling of animal and human tissues *via* UPLC-MS[J]. Nature Protocols，2013，8(1)：17-32.

[15] 韩培杰. 中国白酒大曲微生物多样性研究[D]. 福州：

福建农林大学，2023.
[16] 郭敏. 基于高通量测序对酱香大曲制曲微生态多样性的研究[D]. 贵阳：贵州大学，2018.
[17] 姜晓宇，高菊生，徐凤花，等. 水稻种子内生细菌多样性及其分泌植物生长素能力的测定[J]. 微生物学报，2013，53(3)：269-275.
JIANG X Y，GAO J S，XU F H，et al. Diversity of endophytic bacteria in rice seeds and their secretion of indole acetic acid[J]. Acta Microbiologica Sinica，2013，53(3)：269-275.(in Chinese)
[18] TKALEC V，MAHNIC A，GSELMAN P，et al. Analysis of seed-associated bacteria and fungi on staple crops using the cultivation and metagenomic approaches[J]. Folia Microbiologica，2022，67(3)：351-361.
[19] RAHMAN M M，FLORY E，KOYRO H W，et al. Consistent associations with beneficial bacteria in the seed endosphere of barley (*Hordeum vulgare* L.)[J]. Systematic and Applied Microbiology，2018，41(4)：386-398.
[20] 任婷月，韩英，甄攀，等. 不同品种大麦内生菌的研究分析[J]. 酿酒科技，2022(4)：22-29.
REN T Y，HAN Y，ZHEN P，et al. Study on the endophytes of different varieties of barley[J]. Liquor-Making Science & Technology，2022(4)：22-29.(in Chinese)
[21] 薄涛，吕娜，杨凯环，等. 白酒大曲发酵过程中微生物群落及功能研究进展[J]. 食品科学，2023，44(19)：385-393.
BO T，LÜ N，YANG K H，et al. Recent advances in understanding the composition and functions of microbial community in the fermentation of Baijiu Daqu[J]. Food Science，2023，44(19)：385-393.(in Chinese)
[22] 胡超凡. 古法手酿绍兴黄酒发酵微生态及功效组分解析[D]. 杭州：浙江大学，2021.
[23] 潘强林，岳松，张庆，等. 大曲功能菌的分离及应用进展[J]. 食品与发酵工业，2024，50(16)：408-420.
PAN Q L，YUE S，ZHANG Q，et al. Screen and application of functional microorganism in Daqu：a review[J]. Food and Fermentation Industries，2024，50(16)：408-420.(in Chinese)
[24] FENG M X，HUO Q J，GAN L Y，et al. Effects of four strains of actinomycetes on the content of terpenoids in Baijiu[J]. Foods，，2023，12(7)：1494.
[25] 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)
[26] HAN S，YU S T，ZHU T H，et al. *Nigrospora oryzae* causing black leaf spot disease of *Hibiscus mutabilis* in China[J]. Plant Disease，2021，105(8)：2255.
[27] 于惠源. 黑孢属(*Nigrospora* sp.)丝状真菌次生代谢产物分离纯化及抑制禾谷镰孢研究[D]. 沈阳：沈阳农业大学，2023.
[28] YANG L，XIAN C，LI P，et al. The spatio-temporal diversity and succession of microbial community and its environment driving factors during stacking fermentation of Maotai-flavor Baijiu[J]. Food Research International，2023，169：112892.
[29] KNIGHTS D，KUCZYNSKI J，CHARLSON E S，et al. Bayesian community-wide culture-independent microbial source tracking[J]. Nature Methods，2011，8(9)：761-763.
[30] 周天慈，何宏魁，周庆伍，等. 基于高通量扩增子测序技术解析中高温大曲微生物来源[J]. 食品与发酵工业，2021，47(16)：66-71.
ZHOU T C，HE H K，ZHOU Q W，et al. Exploring the source of microbiota in medium-high temperature Daqu based on high-throughput amplicon sequencing[J]. Food and Fermentation Industries，2021，47(16)：66-71.(in Chinese)
[31] PATEL J K，ARCHANA G. Diverse culturable diazotrophic endophytic bacteria from *Poaceae* plants show cross-colonization and plant growth promotion in wheat[J]. Plant and Soil，2017，417(1)：99-116.
[32] 刘英杰，黄钧，秦辉，等. 浓香型大曲与生产环境微生物群落间的溯源性分析[J]. 食品科学，2022，43(22)：207-214.
LIU Y J，HUANG J，QIN H，et al. Traceability analysis between strong-flavor Daqu，a traditional Chinese fermentation starter for nongxiangxing Baijiu，and microbial communities in the production environment[J]. Food Science，2022，43(22)：207-214.(in Chinese)
[33] 胡小霞，黄永光，涂华彬，等. 酱香型白酒1轮次酿造细菌的菌群结构[J]. 食品科学，2020，41(14)：175-182.
HU X X，HUANG Y G，TU H B，et al. Bacterial diversity structure during the first round of pile and pit fermentation of Moutai-flavor Baijiu[J]. Food Science，2020，41(14)：175-182.(in Chinese)

（责任编辑：闫林红）