



研究报告

中高温大曲制作过程中火圈真菌菌群演替规律及其风味功能

周天慈¹ 孙佳¹ 朱雨婕¹ 何宏魁^{2,3} 周庆伍^{2,3} 曹润洁^{2,3} 马叶胜^{2,3} 杜海^{*1} 徐岩^{*1}

1 工业生物技术教育部重点实验室 江南大学 江苏 无锡 214122

2 安徽古井贡酒股份有限公司 安徽 亳州 236800

3 安徽瑞思威尔科技有限公司 安徽 亳州 236800

摘要:【背景】大曲真菌为白酒发酵过程提供发酵剂和糖化剂,火圈为白酒生产提供重要的风味物质,但针对火圈真菌的菌群演替规律及风味功能尚不清楚。【目的】探索中高温大曲火圈真菌菌群演替规律及风味功能,为优化制曲工艺,提升白酒品质提供理论支撑。【方法】使用顶空固相微萃取结合气相色谱质谱联用技术和内转录间隔区扩增子测序技术,结合中高温大曲制作过程火圈的理化参数,采用冗余分析的手段对大曲制作过程中火圈真菌演替规律及风味功能进行解析。【结果】大曲火圈中的乙酸乙酯、丁酸乙酯、正己酸乙酯、乳酸吡喃糖苷甲酯和油酸乙酯等酯类化合物,苯乙酸乙酯、2,4-二甲基苯甲醛、苯甲醇和苯乙醇等芳香族化合物,酸类化合物乙酸,醇类化合物 3-辛醇、糠醇等化合物的含量高于曲皮、曲心中的含量。大曲制作过程中从第 4 阶段开始,火圈位置温度>40 °C,还原糖的含量>2%,产生美拉德反应,火圈逐渐形成。库德里阿兹威氏毕赤酵母(*Pichia kudriavzevii*)、扣囊复膜酵母(*Saccharomycopsis fibuligera*)是火圈中的优势真菌,在大曲制作的第 2–3 阶段占据了 95% 以上的丰度,此时火圈真菌的多样性最低。【结论】中高温大曲火圈真菌群落演替主要受还原糖含量和温度的影响。大曲火圈为白酒生产提供了重要的酯类、芳香族、酸类、醇类化合物等风味物质,以及 *P. kudriavzevii*、*S. fibuligera* 等白酒发酵的核心酵母菌群,对白酒的生产起着重要的作用。研究结果进一步加深了对火圈的认识,为制曲工艺的调整、白酒品质的提升提供理论依据。

关键词: 中高温大曲火圈, 真菌, 内转录间隔区扩增子测序, 顶空固相微萃取结合气相色谱质谱联用, 理化参数, 群落结构与演替规律

Foundation items: Natural Science Foundation of Jiangsu Province (BK20201341); National Key Research and Development Program of China (2018YFC1604100)

***Corresponding authors:** Tel: 86-510-85918201

E-mail: DU Hai: duhai88@126.com; XU Yan: yxu@jiangnan.edu.cn

Received: 14-01-2021; **Accepted:** 25-02-2021; **Published online:** 19-04-2021

基金项目: 江苏省自然科学基金(BK20201341); 国家重点研发计划(2018YFC1604100)

***通信作者:** Tel: 0510-85918201

E-mail: 杜海: duhai88@126.com; 徐岩: yxu@jiangnan.edu.cn

收稿日期: 2021-01-14; **接受日期:** 2021-02-25; **网络首发日期:** 2021-04-19

Fungal community succession and flavor function in fire cycle during the production of medium-high temperature *Daqu*

ZHOU Tianci¹ SUN Jia¹ ZHU Yujie¹ HE Hongkui^{2,3} ZHOU Qingwu^{2,3}
CAO Runjie^{2,3} MA Yesheng^{2,3} DU Hai^{*1} XU Yan^{*1}

¹ Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education; Jiangnan University, Wuxi, Jiangsu 214122, China

² Anhui GujingGongjiu Company Limited, Bozhou, Anhui 236800, China

³ Anhui Rise Well Technology Company Limited, Bozhou, Anhui 236800, China

Abstract: [Background] *Daqu* fungi provide starter and saccharifying agents for *Baijiu* fermentation process and fire cycle provides important flavor substances for *Baijiu* production, while the fungal community succession and flavor function in fire cycle remain unclear. [Objective] To explore the succession and flavor function of the fungal community in the fire cycle of medium-high temperature *Daqu*, and provide a theoretical support for optimizing the making process of *Daqu* and improving the quality of *Baijiu*. [Methods] The headspace solid phase microextraction combined with gas chromatography-mass spectrometry (HS-SPME-GC-MS) was employed to detect the flavor compounds, and internal transcribed spacer (ITS) amplicon sequencing was performed to analyze the fungal community structure. With the physical and chemical parameters of *Daqu* fire cycle, the redundancy analysis was conducted to explore fungal succession and flavor function of fire cycle during the production of *Daqu*. [Results] Some ester compounds (ethyl acetate, ethyl butyrate, ethyl hexanoate, methyl-alpha-galactopyranoside, and ethyl oleate), aromatic compounds (ethyl phenylacetate, 2,4-dimethylbenzaldehyde, benzyl alcohol, and phenethyl alcohol), acid compounds (acetic acid), alcohol compounds (3-octanol and furfuryl alcohol) had higher content in the fire cycle than in the surface and core of medium-high temperature *Daqu*. From the fourth stage, the fire cycle had the temperature higher than 40 °C and the reducing sugar content greater than 2%, and the Maillard reaction occurred to form the fire cycle. *Pichia kudriavzevii* and *Saccharomycopsis fibuligera* were the dominant fungi in the fire cycle, with the relative abundance over 95% at the 2–3 stage of *Daqu* production. At this time, the fungal diversity in the fire cycle was the lowest. [Conclusion] The succession of fungal community in the fire cycle of medium-high temperature *Daqu* was mainly affected by reducing sugar content and temperature. The fire cycle provided important ester compounds, aromatic compounds, acid compounds, alcohol compounds and other flavor substances for *Baijiu* production, and supplied the core yeast species for *Baijiu* fermentation, such as *P. kudriavzevii* and *S. fibuligera*. Fire cycle played an important role in the production of *Baijiu*. Our study further deepened the understanding of the fire cycle, and offered a theoretical basis for the adjustment of *Daqu*-making process and the improvement of *Baijiu* quality.

Keywords: fire cycle of medium-high temperature *Daqu* fungi, internal transcribed spacer amplicon sequencing, headspace solid phase microextraction combined with gas chromatography-mass spectrometry, physical and chemical parameters, community structure and succession

真菌在自然界普遍存在, 主要包括霉菌、酵母菌等微生物, 在食品发酵^[1]、人类健康^[2]、养分循环^[3]等诸多领域都有重要的作用。大曲为中国白酒发酵提供多种微生物, 以霉菌和酵母菌为主的真菌, 可以分泌淀粉酶、蛋白酶、纤维素酶等多种酶^[4], 并且这些真菌的群落结构和功能对白酒品质控制有很重要的影响^[5]。因此, 解析大

曲制作过程中真菌群落的结构和演替规律对于提高白酒品质具有积极意义。

大曲按制曲温度可分为高温大曲(60 °C 以上)、中高温大曲(50–59 °C)及中温大曲(45–50 °C)^[6]。中高温大曲作为传统大曲重要的分支, 可以细分为曲皮、曲心及火圈 3 部分。火圈是美拉德反应的产物, 主要为黑褐色或者褐色^[7]。一般是由于制

曲过程中糖与氨基酸不断积累,二者在大曲内部的高温状态下发生美拉德反应,产生褐(黑)色素,并在曲心与曲皮中间部位沉积而形成^[8]。火圈形成过程中产生的呋喃、呋喃硫醇、噻吩、噻唑等化合物使得曲香优雅而浓郁,同时火圈中的黑色素物质部分溶于水,具有还原性和酸性,对酒风味和风格的形成也具有积极作用^[9]。但目前关于大曲中火圈的研究较少,火圈优良的风味物质也一直被忽视。

目前,借助内转录间隔区(Internal Transcribed Spacer, ITS)扩增子测序技术,研究者可以深入分析大曲的曲皮、曲心真菌微生物群落结构^[10]。例如解析大曲曲皮、曲心真菌之间差异时,研究者运用 ITS 扩增子技术发现曲皮真菌群落多样性和丰度均高于曲心样品;其中子囊菌门是曲皮、曲心中唯一的优势菌门^[11]。探索大曲曲皮、曲心真菌分布情况时,研究者发现大曲中假丝酵母属(*Candida*)、曲霉属(*Aspergillus*)、根霉属(*Rhizopus*)等真菌在大曲的曲皮、曲心中是随机分布的^[12]。在 ITS 扩增子测序技术的基础上,研究者借助溯源(Source Tracker)分析,发现大曲中扣囊复膜酵母(*Saccharomycopsis fibuligera*)、毕赤酵母(*Pichia kudriavzevii*)、米根霉(*Rhizopus oryzae*)、米曲霉(*Aspergillus oryzae*)等真菌主要起源于大曲的制作环境(主要是工具和室内地面)^[13]。然而火圈中的真菌却是鲜有人研究。因此,解析大曲制作过程中火圈真菌菌群演替规律,对于制曲工艺的调整及白酒品质的提升具有积极的意义。

本研究使用顶空固相微萃取结合气相色谱质谱联用技术(Headspace Solid Phase Microextraction Combined with Gas Chromatography-Mass Spectrometry, HS-SPME-GC-MS)和 ITS 扩增子测序技术,从风味物质和菌群结构两方面阐述了大曲火圈对白酒发酵的重要性,同时运用冗余分析的手段,解析了火圈真菌的演替规律,从生物学的角度为制曲工艺的调整、优化甚至现代化提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 样品的采集

样品收集于安徽省某酒厂的典型中高温大曲,其制作阶段可以分为上霉、晾霉、潮火、大火、后火、成曲6个阶段。选择3个曲房作为平行跟踪采集样本,每个曲房在曲架第1层、第3层、第5层设置6个采集点,然后汇总后约500 g,随后转移至-80 °C 冰箱保存。样品分别在入曲房时和6个阶段结束时采集(即分别在0、1、3、10、18、24、31 d取样),共进行7次取样。每个曲块取样位置如图1所示,从曲块的断截面计算,火圈是位于距离曲块表面1.2–1.7 cm的区域。同时第六阶段结束时对曲皮、曲心也采用同样的方法取样保存。

1.2 主要试剂和仪器

氯化钠、三氯甲烷、乙醇、异戊醇等,国药集团化学试剂(北京)有限公司;饱和酚溶液,生

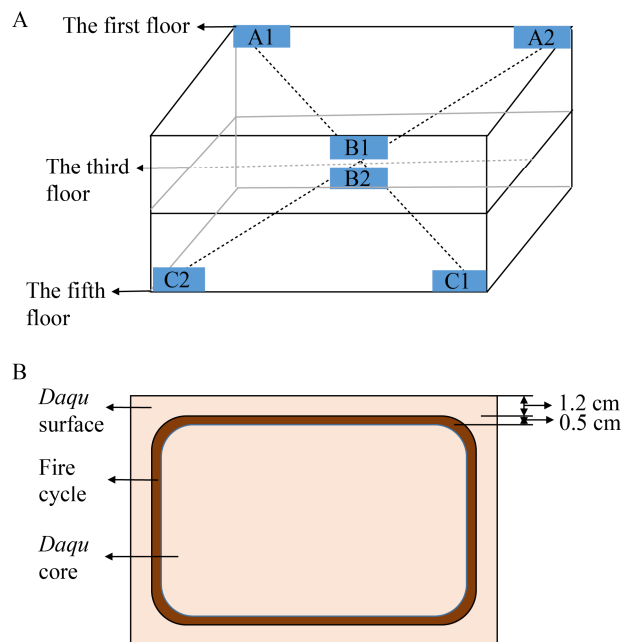


图1 样品采集示意图

Figure 1 Schematic diagram of sample collection

注: A: 曲房大曲取样示意图; B: 火圈位置样品取样示意图
Note: A: Schematic diagram of Daqu sampling in Qufang; B: Schematic diagram of sampling of fire cycle

工生物工程(上海)股份有限公司。NanoDrop 蛋白核酸测定分光光度计, Thermo Fisher Scientific 公司; 高速冷冻离心机, Eppendorf 公司; Illumina MiSeq PE300 和 HiSeq 测序平台, Illumina 公司。

1.3 核酸提取、测序及生物信息学分析

大曲火圈样品基因组总 DNA 提取参考宋哲玮等^[14]的方法。测序反应体系和条件参考 Hertz 等^[15]的方法。生物信息学的分析方法参考宋哲玮等^[14]的方法。

1.4 风味物质及理化指标的测定

中高温大曲曲皮、火圈、曲心中挥发性风味物质浓度采用 HS-SPME-GC-MS 检测, 方法参考 Ji 等^[16]。中高温大曲制作过程中曲温是将温度计插入曲房两端及中心位置曲块中心实现监测。火圈的 pH 通过 pH 计测定。含水量、还原糖的测定参考陈蒙恩等^[17]的方法。

1.5 数据分析及绘图

统计分析采用 SPSS 22 进行, 显著性水平设定在 5%。冗余分析(Redundancy Analysis, RDA)使用 CANOCO 软件实现; 绘图采用 Origin 9.0 进行。

1.6 数据的公开

研究产生的所有 DNA 序列提交 NCBI 数据库获得登录号 PRJNA691687。

2 结果与分析

2.1 中高温大曲曲皮、火圈及曲心挥发性风味物质分析

如图 2 所示, 相比于大曲曲皮和曲心, 火圈能够检测出更高的某些酯类化合物、酸类化合物、芳香族化合物等(表 1)。大曲火圈检测到的酯类化合物总的相对含量为 0.22 ± 0.11 mg/L, 而曲皮、曲心检测到的酯类化合物总的相对含量仅为 0.13 ± 0.00 mg/L、 0.14 ± 0.01 mg/L。其中, 乙酸乙酯(0.04 ± 0.01 mg/L)、丁酸乙酯(0.01 ± 0.00 mg/L)、正己酸乙酯(0.02 ± 0.00 mg/L)、乳酸吡喃糖苷甲酯(0.07 ± 0.00 mg/L)、油酸乙酯(0.01 ± 0.01 mg/L)等酯类化合物的含量明显高于曲皮和曲心中的含量。

研究表明, 酯类化合物大多具有芳香性气味, 使白酒具有水果的香气, 是决定白酒风格与品质的关键物质^[18]。尤其乙酸乙酯和丁酸乙酯作为四大酯家族成员在各香型白酒中含量都较多, 在风味酯中处于主导地位, 对浓香型、清香型、凤香型和米香型等酒风格的形成有着重要的作用^[19]。

此外, 大曲火圈中芳香族化合物如苯乙酸乙酯(0.01 ± 0.01 mg/L)、2,4-二甲基苯甲醛(0.01 ± 0.01 mg/L)、苯甲醇(0.06 ± 0.03 mg/L)和苯乙醇(0.43 ± 0.07 mg/L), 酸类化合物如乙酸(0.02 ± 0.02 mg/L), 醇类化合物如 3-辛醇(0.02 ± 0.02 mg/L)、糠醇(0.04 ± 0.06 mg/L)等的含量也高于曲皮、曲心中的含量。大量研究表明, 芳香族化合物、酸类化合物、醇类化合物对成品白酒的质量具有很大影响^[20]。其中, 芳香族化合物具有阈值低、香味强度大、香味保留时间长的特点^[21], 酸类和酯类化合物具有在一定浓度范围内, 具有含量越高、白酒品质越好的特点^[22]。综上所述, 大曲火圈对白酒风味起着重要的贡献, 应当引起研究者的关注。

2.2 中高温大曲制作过程中火圈理化参数的变化

如图 3 所示, 大曲温度变化呈倒 V 型, 在第 4 阶段结束曲温达到最高值 50.17 ± 1.31 °C。大曲火圈含水量从第 3 阶段起水分蒸发速率加快, 到第 6 阶段结束, 火圈的含水量在 $16.66\% \pm 0.15\%$ 。大曲火圈 pH 在第二阶段上升至 6.34 ± 0.25 后缓慢降低, 并最终维持在 5.2 左右。这是因为大曲中产酸细菌(如乳酸菌)进行新陈代谢产酸, 增加了酸度。随着大曲制作进行, 温度升高, 水分减少, 产酸细菌数量也减少, 产生的酸性物质减少, 而且由于酯化反应或相关香气物质产生, 原始产生的酸减少, 所以酸度整体下降^[23]。大曲火圈中还原糖含量从第 3 阶段开始直线上升, 在第 5 阶段达到最高水平 $4.41\% \pm 0.86\%$ 。结合图 3、4 可以得出, 从第 4 阶段开始, 温度 >40 °C, 还原糖含量 $>2\%$ 左右, 产生美拉德反应^[8], 导致火圈的形成。

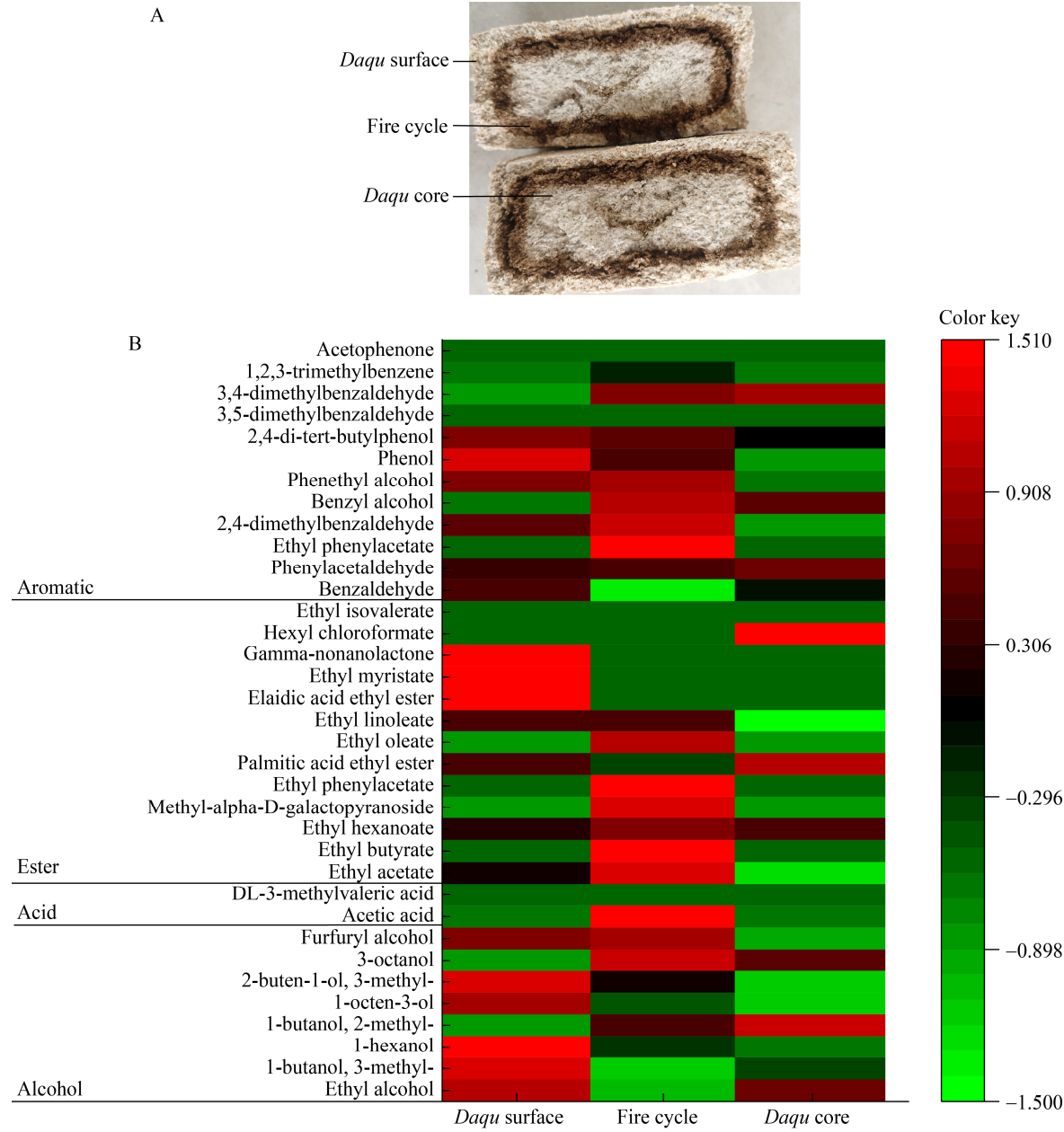


图 2 大曲曲皮、火圈、曲心的位置及挥发性物质

Figure 2 The position and volatile substances of *Daqu* surface, fire cycle and *Daqu* core

注：A：大曲位置分布；B：大曲不同位置挥发性物质

Note: A: *Daqu* location distribution; B: Volatile substances in different locations of *Daqu*

2.3 中高温大曲制作过程中火圈真菌菌群的多样性分析

通过丰富度指数(Chao1)评价大曲制作过程中火圈真菌种群多样性(图 5A)。结果显示，大曲火圈真菌多样性随大曲制作时间增加呈先降低后上升的趋势。

火圈的第 0 阶段真菌多样性高于其他 5 个阶段，同时第 0-2 阶段火圈真菌群落多样性逐渐降低，这是真菌种群驯化的过程。从 3-6 阶段火圈的真菌群落多样性逐渐上升，这是真菌种群逐渐选择富集的过程。综上所述，大曲制作过程中火圈真菌发生了物种选择。

表 1 大曲曲皮、火圈及曲心挥发性物质汇总表

Table 1 Summary table of volatile substances of *Daqu* surface, fire cycle and *Daqu* core

Name	Relative content of volatile substances in <i>Daqu</i> surface (mg/L)	Relative content of volatile substances in fire cycle (mg/L)	Relative content of volatile substances in <i>Daqu</i> core (mg/L)
Ethanol alcohol	0.44±0.06	0.33±0.02	0.48±0.03
1-butanol, 3-methyl-	0.24±0.06	0.10±0.01	0.16±0.02
1-hexanol	0.15±0.01	0.03±0.00	0.00±0.00
1-butanol, 2-methyl-	0.00±0.00	0.01±0.01	0.04±0.01
1-octen-3-ol	0.03±0.00	0.01±0.01	0.00±0.00
2-buten-1-ol, 3-methyl-	0.03±0.01	0.02±0.01	0.01±0.00
3-octanol	0.00±0.00	0.02±0.02	0.03±0.01
Furfuryl alcohol	0.07±0.04	0.04±0.06	0.02±0.01
Acetic acid	0.00±0.00	0.02±0.00	0.00±0.00
DL-3-methylvaleric acid	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00
Ethyl acetate	0.02±0.00	0.04±0.01	0.00±0.00
Ethyl butyrate	0.00±0.00	0.01±0.00	0.00±0.00
Ethyl hexanoate	0.01±0.00	0.02±0.00	0.02±0.01
Methyl- α -D-galactopyranoside	0.00±0.00	0.07±0.01	0.00±0.00
Ethyl phenylacetate	0.00±0.00	0.01±0.01	0.00±0.00
Palmitic acid ethyl ester	0.06±0.00	0.04±0.01	0.07±0.02
Ethyl oleate	0.01±0.00	0.01±0.01	0.00±0.00
Ethyl linoleate	0.02±0.00	0.02±0.01	0.00±0.00
Elaidic acid ethyl ester	0.01±0.00	0.01±0.00	0.00±0.00
Ethyl myristate	0.01±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00
Gamma-nonanolactone	0.01±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00
Hexyl chloroformate	0.00±0.00	0.00±0.00	0.05±0.01
Ethyl isovalerate	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00
Benzaldehyde	0.63±0.15	0.24±0.09	0.62±0.06
Phenylacetaldehyde	0.04±0.01	0.06±0.01	0.06±0.02
Ethyl phenylacetate	0.00±0.00	0.01±0.01	0.00±0.00
2,4-dimethylbenzaldehyde	0.01±0.01	0.01±0.01	0.00±0.00
Benzyl alcohol	0.03±0.01	0.06±0.03	0.08±0.01
Phenethyl alcohol	0.32±0.09	0.43±0.07	0.31±0.05
Phenol	0.00±0.00	0.01±0.01	0.00±0.00
2,4-di-tert-butylphenol	0.01±0.01	0.01±0.01	0.01±0.01
3,5-dimethylbenzaldehyde	0.00±0.00	0.01±0.01	0.00±0.00
3,4-dimethylbenzaldehyde	0.00±0.00	0.01±0.01	0.03±0.01
1,2,3-trimethylbenzene	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00
Acetophenone	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00

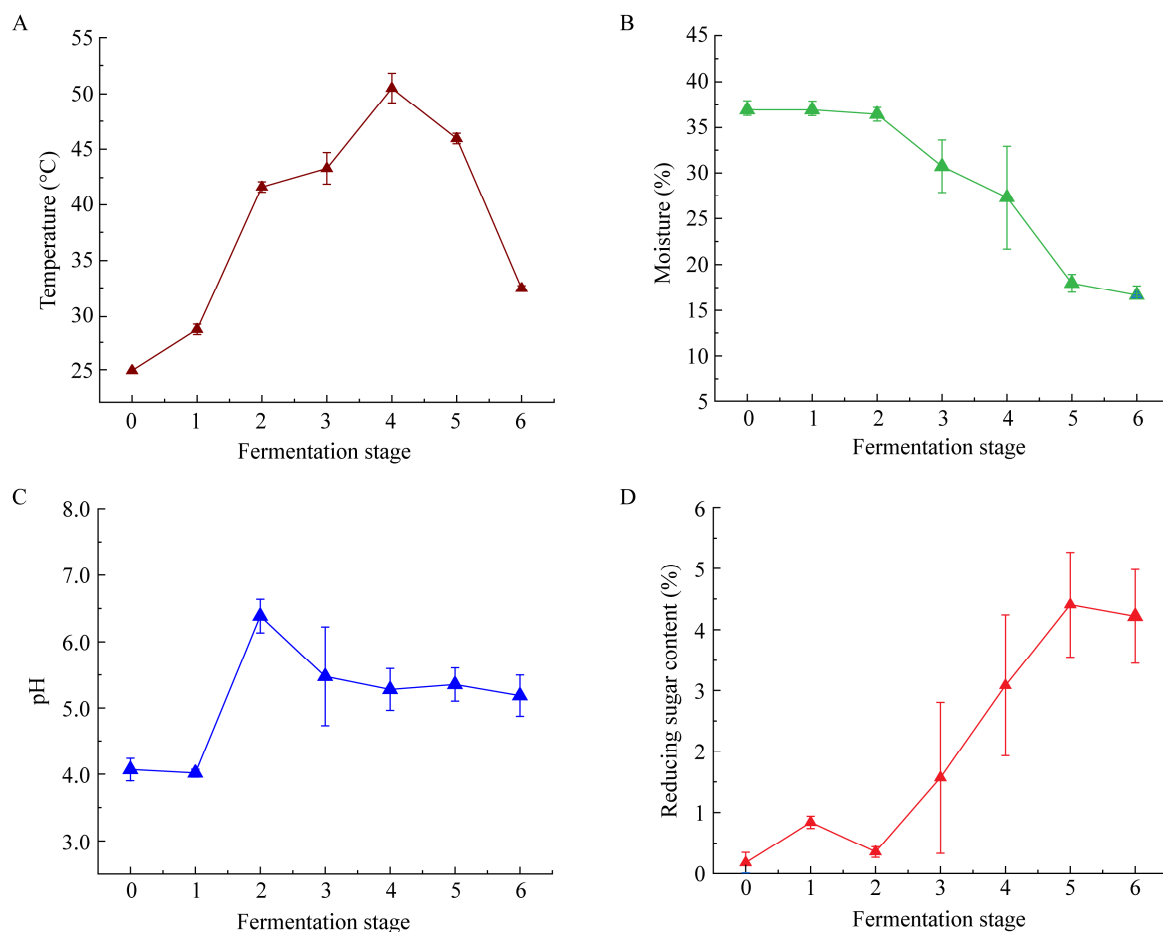


图 3 大曲制作过程中火圈理化参数的变化

Figure 3 Changes of physical and chemical parameters of fire cycle during *Daqu* fermentation

注: A: 曲温的变化; B: 火圈含水量的变化; C: 火圈 pH 的变化; D: 火圈还原糖的变化

Note: A: Variation of *Daqu* temperature; B: Variation of fire cycle moisture; C: Variation of fire cycle pH; D: Variation of fire cycle reducing sugar

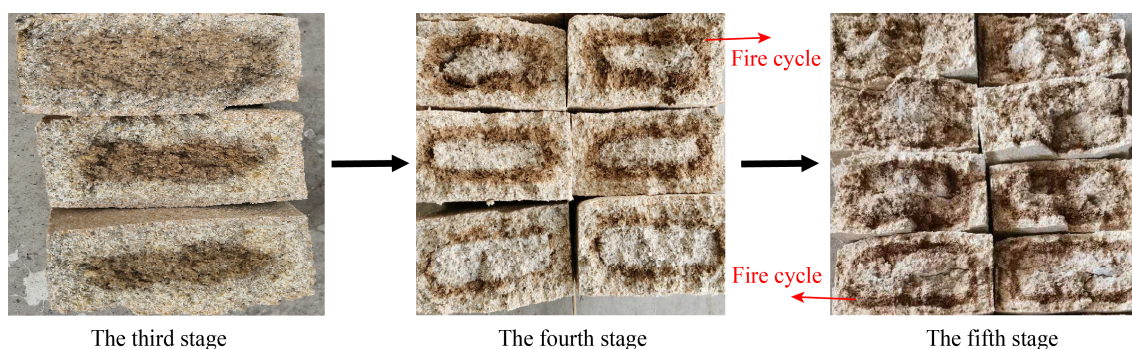


图 4 大曲制作过程火圈形成的阶段

Figure 4 The forming stage of the fire cycle during *Daqu* fermentation

注: 照片是在每个阶段结束时拍摄

Note: Photos were taken at the end of each stage

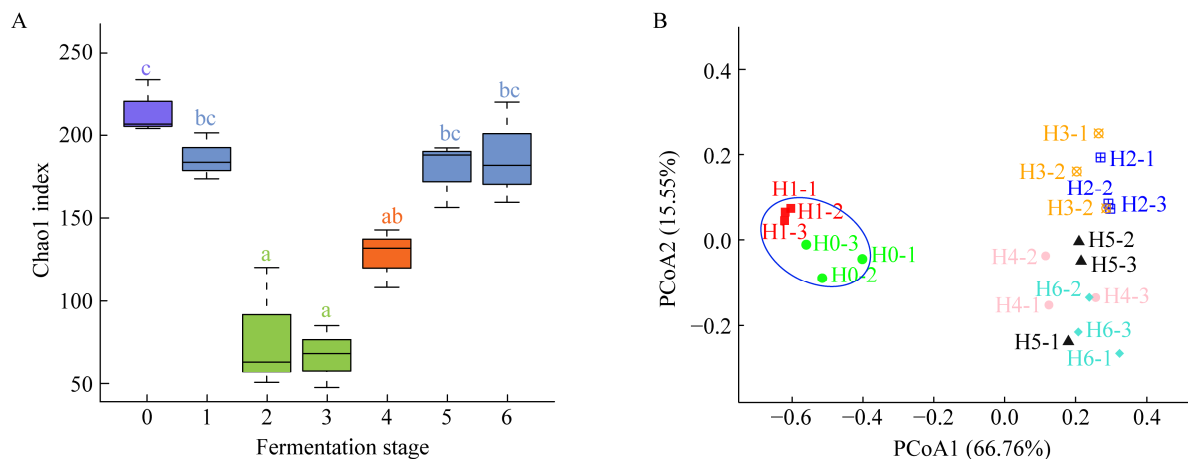


图5 大曲制作过程中火圈微生物的多样性分析

Figure 5 Diversity analysis of microorganisms in the fire cycle during *Daqu* fermentation

注: A: 大曲制作过程火圈真菌 α 多样性分析; B: 大曲制作过程火圈真菌 β 多样性分析。不同小写字母表示具有显著性差异 ($P < 0.05$); 0–6: 不同的数字表示不同的制作阶段

Note: A: Alpha diversity analysis of fire cycle fungi during *Daqu* production; B: Beta diversity analysis of fire cycle fungi during *Daqu* production. Different lowercase letters indicate significant differences ($P < 0.05$); 0–6: Different numbers indicate different fermentation stages

为了进一步考察大曲真菌群落结构随时间变化的特点, 通过基于 Bray-Curtis 距离的主坐标分析(Principal Coordinate Analysis, PCoA)进一步表征制作过程中火圈真菌种群随时间变化的特点(图 5B)。PCoA 结果显示前 2 个坐标可代表火圈真菌种群 82.31%, 说明 Bray-Curtis PCoA 满足对样本差异解释的需求。图 5B 显示火圈第 0–1 阶段的真菌菌群结构与第 2–4 阶段的真菌菌群结构可以明显地区分开, 说明从第 2 阶段开始火圈的真菌群结构已经发生了改变。

2.4 火圈真菌菌群结构分析

为了揭示大曲制作过程中火圈真菌结构的变化及差异, 对真菌种水平组成进行了分析, 图 6 展示了平均丰度大于 1% 的真菌结构组成。从图 6 看出, 在大曲整个制作过程中, *Pichia kudriavzevii* 与 *Saccharomycopsis fibuligera* 的总丰度在各阶段真菌中分别占 41.60%、60.88%、95.93%、98.53%、85.75%、84.34%、74.66%, 均占据较高的丰度。其中前中期以 *P. kudriavzevii* 为主, 后期以 *S. fibuligera* 为主。在 0–1 阶段, 随着 *P. kudriavzevii*

与 *S. fibuligera* 所占丰度的增加, 火圈真菌的多样性逐渐降低; 在第 2–3 阶段 *P. kudriavzevii* 与 *S. fibuligera* 占据了 95% 以上的丰度, 火圈真菌的多样性最低; 而从第 4 阶段开始, 随着 *P. kudriavzevii* 与 *S. fibuligera* 所占丰度的减少, 火圈真菌的多样性逐渐增加。这些结果与图 5 的结果是一致的。

研究证明, *P. kudriavzevii* 和 *S. fibuligera* 是白酒发酵过程中的核心酵母^[14]。*P. kudriavzevii* 不仅在白酒的乙醇生成过程中起着决定性的作用^[24], 还能够产生苯乙醇等对白酒风味有重要贡献的代谢产物^[25]。此外, *P. kudriavzevii* 还保证了微生物群落和发酵过程的稳定性, 使白酒发酵过程具有自发性以及可重复性的特点^[26]。*S. fibuligera* 则可以提高发酵初期糖化淀粉和酸性蛋白酶的活性以及乙醇的合成速率^[27], 还可以改善酒的香气, 产生许多如乙酸乙酯和丁酸乙酯等令人愉悦的香气化合物^[28]。在上文中已经指出火圈中苯乙醇、乙酸乙酯及丁酸乙酯等风味物质的含量高于大曲曲皮、曲心的含量, 这可能与火圈中 *P. kudriavzevii* 和 *S. fibuligera* 占主导地位有关。

2.5 火圈真菌群落驱动因素的解析

为了分析大曲制作过程中火圈真菌菌群结构演替变化的驱动因素, 采用 RDA 解析温度、pH、含水量与还原糖含量对火圈真菌群落的影响(图 7)。由图 7A 可知, 不同阶段影响火圈真菌结构演替变化的理化参数不同。在火圈

形成的时候, 第 4–5 阶段受 pH、温度和还原糖含量的影响, 而第 6 阶段受还原糖含量的影响最大。

同时, 对图 6 中大曲制作过程火圈的优势真菌(平均丰度>1%)与上述理化指标也进行了 RDA 分析(图 7B)。结果显示, 火圈中优势真菌

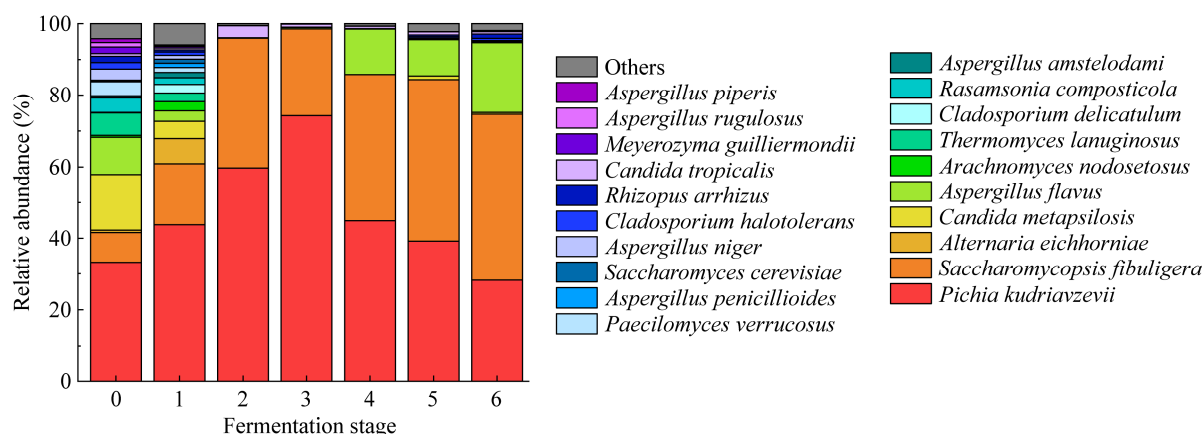


图 6 大曲制作过程中火圈真菌种水平结构组成

Figure 6 The structural distributions in fire cycle fungi during *Daqu* fermentation at the species level

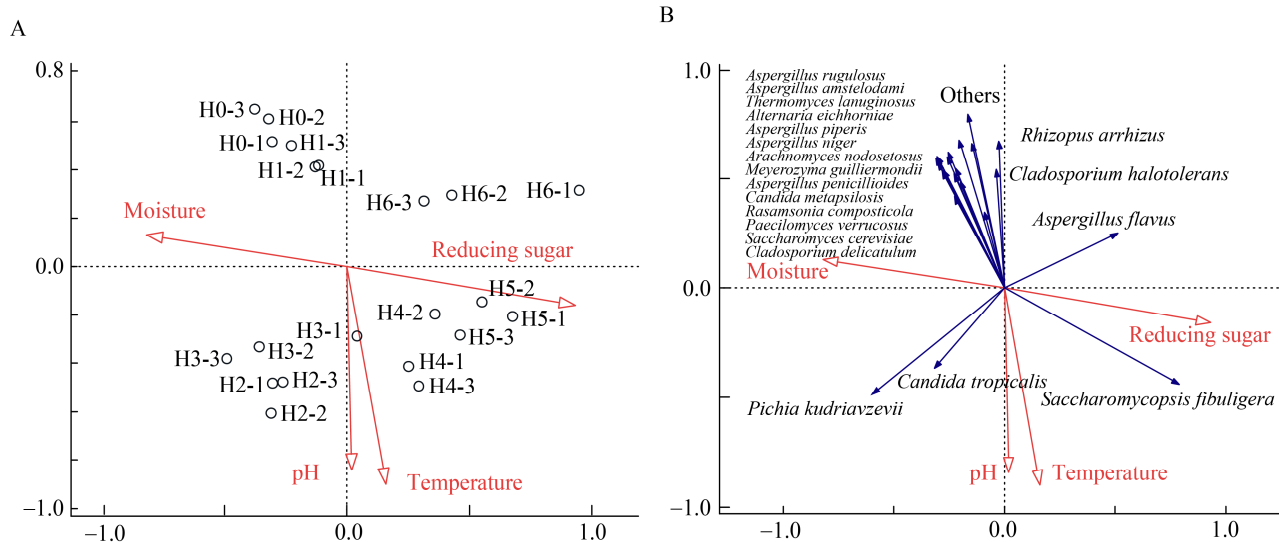


图 7 大曲制作过程火圈真菌与理化参数的冗余分析

Figure 7 Redundant analysis of the fungi and physical and chemical parameters in the fire cycle

注: A: 不同阶段的样本与主要理化参数的冗余分析; B: 火圈真菌与主要理化参数的冗余分析; H0–H6: 大曲不同的制作阶段; “–1”–“–3”: 一式 3 份的样品

Note: A: Redundant analysis of fire cycle samples in different stages and main physical and chemical parameters; B: Redundant analysis of the fungi and main physical and chemical parameters in the fire cycle; H0–H6: Different numbers indicate different fermentation stages; “–1”–“–3”: Triplicate samples

S. fibuligera 的生长受还原糖含量的影响最大, 而 *P. kudriavzevii* 的生长则受含水量、pH、温度的多重影响。同时结合表 2, 得出在整个大曲火圈真菌菌群的演替中, 还原糖含量(37.6%)和温度(20.6%)是主要的驱动因素, 而含水量和 pH 的总解释度仅为 8%, 对火圈真菌菌群的演替的影响较低。

3 讨论与结论

大曲中真菌为中国白酒的发酵过程提供了重要的糖化剂和发酵剂, 对白酒的品质起着举足轻重的作用^[29]。同时, 大曲火圈也对白酒的生产提供了重要的风味物质^[8]。但是长期以来, 多数研究者只通过 rDNA ITS 扩增子测序对大曲制作过程中曲皮、曲心及大曲真菌的微生物群落结构进行研究^[30], 而忽视了对火圈真菌的研究。随着大曲制作秘密逐步被揭开^[31], 对中高温大曲火圈真菌微生物群落的研究也会越来越深入。

研究表明, 大曲火圈对白酒的生产提供了如呋喃、噻吩等重要的风味物质^[8]。本研究也通过 HS-SPME-GC-MS 发现火圈检测到的酯类化合物的相对总含量高于曲皮、曲心中酯类化合物总的相对含量。其中, 乙酸乙酯、丁酸乙酯的含量明显高于曲皮和曲心中的含量。乙酸乙酯和丁酸乙酯作为四大酯家族成员, 既是浓香型白酒的骨架酯, 也是清香型白酒的主体香^[19]。此外, 火圈中苯乙酸乙酯、苯甲醇和苯乙醇等芳香族化合物以及酸类化合物如乙酸, 醇类化合物如 3-辛醇、糠醇等化合物的含量也高于曲皮和曲心中的含量, 而这些物质对白酒的风味形成都具有重要的意义^[20-22]。

表 2 大曲制作过程中火圈真菌菌群演替与理化的关系
Table 2 The relationship between the succession of the fire cycle fungal community and the physical and chemical parameters during *Daqu* fermentation

Name	Explains (%)	Contribution (%)	Pseudo-F	P
Reducing sugar	37.6	56.8	11.5	0.002
Temperature	20.6	31.1	8.9	0.002
Moisture	2.6	4.0	1.1	0.356
pH	5.4	8.1	2.6	0.084

同时, 根据中高温大曲火圈开始出现的阶段(图 4), 结合火圈理化变化, 我们发现从第 4 阶段开始, 温度>40 °C, 还原糖的含量>2%, 发生美拉德反应, 大曲开始形成火圈。发生美拉德反应的温度与还原糖含量与庄名扬的研究结果相符合^[9]。

本文运用 rDNA ITS 扩增子测序技术, 探究了大曲火圈真菌菌群结构和演替规律。研究发现, 火圈真菌的多样性变化, 呈现倒 V 型; *P. kudriavzevii*、*S. fibuligera* 是大曲制作过程中火圈的优势真菌, 但 *P. kudriavzevii* 以大曲制作前期为主, *S. fibuligera* 以中后期为主。研究证明 *P. kudriavzevii*、*S. fibuligera* 作为白酒发酵核心酵母, 对白酒品质有着直接影响^[14]。采用 RDA 分析发现, 还原糖含量(37.6%)是驱动火圈真菌群落演替的最主要因素, 其次是温度(20.6%)。

本研究跟踪大曲制作过程中火圈理化参数的变化, 揭示了火圈形成的机理。采用 HS-SPME-GC-MS 和 rDNA ITS 扩增子测序技术, 研究了中高温大曲发酵过程中火圈真菌群落结构, 从风味物质和菌群结构 2 方面阐述了大曲火圈对白酒发酵的重要性, 同时运用冗余分析的手段, 解析了驱动火圈真菌群落演替的关键因子。本研究加深了研究者对于大曲火圈真菌对整个白酒生产过程贡献的认识, 促使生产者加强大曲制作过程中对火圈形成的控制, 为改良制曲工艺, 提升大曲品质及指导后期酿酒提供理论参考。

REFERENCES

- [1] Wang XS, Du H, Xu Y. Source tracking of prokaryotic communities in fermented grain of Chinese strong-flavor liquor[J]. International Journal of Food Microbiology, 2017, 244: 27-35
- [2] Kong HH, Morris A. The emerging importance and challenges of the human mycobiome[J]. Virulence, 2017, 8(3): 310-312
- [3] Nilsson RH, Anslan S, Bahram M, Wurzbacher C, Baldrian P, Tedersoo L. Mycobiome diversity: high-throughput sequencing and identification of fungi[J]. Nature Reviews Microbiology, 2019, 17(2): 95-109
- [4] Wang BW, Wu Q, Xu Y, Sun BG. Specific volumetric weight-driven shift in microbiota compositions with saccharifying activity change in starter for Chinese baijiu

- fermentation[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2018, 9: 2349
- [5] Li P, Liang HB, Lin WT, Feng F, Luo LX. Microbiota dynamics associated with environmental conditions and potential roles of cellulolytic communities in traditional Chinese cereal starter solid-state fermentation[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2015, 81(15): 5144-5156
- [6] Xing G, Ao ZH, Wang ST, Deng B, Wang XJ, Dong ZC. Analysis of the change in physiochemical indexes during the production process of daqu of different temperature[J]. *Liquor-Making Science & Technology*, 2014(6): 20-23 (in Chinese)
- 邢钢, 敖宗华, 王松涛, 邓波, 王小军, 董智超. 不同温度大曲制曲过程理化指标变化分析研究[J]. *酿酒科技*, 2014(6): 20-23
- [7] Zhang ZK, Fan JH, Yang FY, Wu WG. Summary of research on the quality problems in pottery-flavor daqu production[J]. *Liquor Making*, 2018, 45(6): 82-84 (in Chinese)
- 张振科, 樊建辉, 杨方玉, 吴卫光. 陶融型大曲生产过程中几个质量问题的研究概述[J]. *酿酒*, 2018, 45(6): 82-84
- [8] Zhang LX. Water cycle and fire cycle of Xifeng daqu[J]. *Liquor-Making Science & Technology*, 2005(11): 38-39 (in Chinese)
- 张立新. 凤型大曲的水圈和火圈[J]. *酿酒科技*, 2005(11): 38-39
- [9] Zhuang MY. Reaction products of Maillard reaction and flavors & tastes of Chinese liquors[J]. *Liquor-Making Science & Technology*, 2005(5): 34-38 (in Chinese)
- 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
- [10] 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): 67
- [11] Hu XL, Wang KL, Niu GJ, Qiao YJ, Zhang Y, He PX. Analysis of microbial community diversity in medium temperature Daqu based on high-throughput sequencing technology[J]. *Journal of Light Industry*, 2019, 34(4): 21-29 (in Chinese)
- 胡晓龙, 王康丽, 牛广杰, 乔亚娟, 张玉, 何培新. 基于高通量测序技术的中温大曲中微生物群落多样性解析[J]. *轻工学报*, 2019, 34(4): 21-29
- [12] Jin Y, Li DY, Ai M, Tang QX, Huang J, Ding XF, Wu CD, Zhou RQ. Correlation between volatile profiles and microbial communities: a metabonomic approach to study Jiang-flavor liquor Daqu[J]. *Food Research International: Ottawa, Ont*, 2019, 121: 422-432
- [13] Du H, Wang XS, Zhang YH, Xu Y. 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
- [14] Song ZW, Du H, Nie Y, Xu Y. Identification of core yeasts and their functions in the fermentation process of Maotai-flavor Baijiu[J]. *Microbiology China*, 2020, 47(11): 3504-3514 (in Chinese)
- 宋哲玮, 杜海, 聂尧, 徐岩. 酱香型白酒发酵过程中核心酵母的鉴别及其功能[J]. *微生物学通报*, 2020, 47(11): 3504-3514
- [15] Hertz M, Jensen IR, Jensen LØ, Thomsen SN, Winde J, Dueholm MS, Sørensen LH, Wollenberg RD, Sørensen HO, Sondergaard TE, et al. The fungal community changes over time in developing wheat heads[J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2016, 222: 30-39
- [16] Ji M, Du H, Xu Y. Structural and metabolic performance of p-cresol producing microbiota in different carbon sources[J]. *Food Research International: Ottawa, Ont*, 2020, 132: 109049
- [17] Chen ME, Han SN, Hou JG, Li JM, Chen WP, Li H, Deng J, Hu XL. The change and correlational study of biochemical indices of Tao Rong-Daqu during the process of production and storage[J]. *Food and Fermentation Industries*, 2020, 46(13): 146-151 (in Chinese)
- 陈蒙恩, 韩素娜, 侯建光, 李建民, 陈伟平, 李华, 邓杰, 胡晓龙. 陶融型大曲培养贮存过程生化指标变化规律及相关性研究[J]. *食品与发酵工业*, 2020, 46(13): 146-151
- [18] Xiao ZB, Yu D, Niu YW, Chen F, Song SQ, Zhu JC, Zhu GY. Characterization of aroma compounds of Chinese famous liquors by gas chromatography-mass spectrometry and flash GC electronic-nose[J]. *Journal of Chromatography B, Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 2014, 945/946: 92-100
- [19] Cui DY, Zhang Y, Xu J, Zhang CY, Li W, Xiao DG. PGK1 promoter library for the regulation of acetate ester production in *Saccharomyces cerevisiae* during Chinese baijiu fermentation[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2018, 66(28): 7417-7427
- [20] Fan WL, Shen HY, Xu Y. Quantification of volatile compounds in Chinese soy sauce aroma type liquor by stir bar sorptive extraction and gas chromatography-mass spectrometry[J]. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2011, 91(7): 1187-1198
- [21] Wang XX, Fan WL, Xu Y. Comparison on aroma compounds in Chinese soy sauce and strong aroma type liquors by gas chromatography-olfactometry, chemical quantitative and odor activity values analysis[J]. *European Food Research and Technology*, 2014, 239(5): 813-825
- [22] Jia W, Fan ZB, Du A, Li YL, Zhang R, Shi QY, Shi L, Chu XG. Recent advances in Baijiu analysis by chromatography based technology: a review[J]. *Food Chemistry*, 2020, 324: 126899
- [23] Du RB, Wu Q, Xu Y. Chinese liquor fermentation: identification of key flavor-producing *Lactobacillus* spp. by quantitative profiling with indigenous internal standards[J].

- Applied and Environmental Microbiology, 2020, 86(12): e00456-00420
- [24] Chen B, Wu Q, Xu Y. Filamentous fungal diversity and community structure associated with the solid state fermentation of Chinese Maotai-flavor liquor[J]. International Journal of Food Microbiology, 2014, 179: 80-84
- [25] Benito Á, Jeffares D, Palomero F, Calderón F, Bai FY, Bähler J, Benito S. Selected *Schizosaccharomyces pombe* strains have characteristics that are beneficial for winemaking[J]. PLoS One, 2016, 11(3): e0151102
- [26] Yuangsaard N, Yongmanitchai W, Yamada M, Limtong S. Selection and characterization of a newly isolated thermotolerant *Pichia kudriavzevii* strain for ethanol production at high temperature from cassava starch hydrolysate[J]. Antonie Van Leeuwenhoek, 2013, 103(3): 577-588
- [27] Su C, Zhang KZ, Cao XZ, Yang JG. Effects of *Saccharomycopsis fibuligera* and *Saccharomyces cerevisiae* inoculation on small fermentation starters in Sichuan-style Xiaoqu liquor[J]. Food Research International: Ottawa, Ont, 2020, 137: 109425
- [28] Yang YR, Zhong HY, Yang T, Lan CH, Zhu H. Characterization of the key aroma compounds of a sweet rice alcoholic beverage fermented with *Saccharomycopsis fibuligera*[J]. Journal of Food Science and Technology, 2020: 1-13
- [29] Zheng XW, Yan Z, Nout MJR, Smid EJ, Zwietering MH, Boekhout T, Han JS, Han BZ. Microbiota dynamics related to environmental conditions during the fermentative production of Fen-Daqu, a Chinese industrial fermentation starter[J]. International Journal of Food Microbiology, 2014, 182/183: 57-62
- [30] Li B, Hu JJ, Zhang LL, Li SL, Li XS, Guo SX. Analysis of fungi community of strong-flavor and sesame-flavor Baijiu Jiuqu using high-throughput sequencing[J]. China Brewing, 2019, 38(10): 96-100 (in Chinese)
李斌, 胡俊杰, 张兰兰, 李绍亮, 李学思, 郭书贤. 基于高通量测序浓香型和芝麻香型白酒酒曲真菌群落结构的分析[J]. 中国酿造, 2019, 38(10): 96-100
- [31] Jin GY, Zhu Y, Xu Y. Mystery behind Chinese liquor fermentation[J]. Trends in Food Science & Technology, 2017, 63: 18-28