

郭小龙, 邓灿, 张明春, 等. 人工合成菌群替代传统母曲对高温大曲质量的影响[J]. 华中农业大学学报, 2024, 43(4): 239-248.
DOI: 10.13300/j.cnki.hnlkxb.2024.04.026

人工合成菌群替代传统母曲对高温大曲质量的影响

郭小龙¹, 邓灿¹, 张明春², 高瑞杰¹, 刘蒲临¹, 熊笠君², 缪礼鸿¹

1. 武汉轻工大学生命科学与技术学院, 武汉 430023; 2. 湖北白云边酒业股份有限公司, 松滋 434200

摘要 传统高温大曲是经自然发酵而生产的, 存在微生物群落组成复杂、所需的风味组分及含量难以控制等缺点。为了优化高温大曲微生物菌群结构和提高大曲品质, 以小麦为原料, 将高温大曲中分离筛选的地衣芽孢杆菌 BL44、酿酒酵母 SCY62、宛氏拟青霉 PV3、微小根毛霉 RP1 和嗜热子囊菌 TC1 分别制备成固态菌剂, 按不同添加比例构建 2 种人工合成菌群替代传统母曲(CK)制作高温大曲, 并进行实验室酿酒试验分析。高通量测序结果表明, 3 种大曲的优势真菌属为 *Lichtheimia*, 优势细菌属为 *Bacillus*。大曲的理化指标测定结果显示, 接种人工合成菌群的高温大曲的液化力和糖化力比 CK 均有显著提高。气相色谱-质谱分析结果显示, 接种人工合成菌群替代传统母曲能显著提高大曲及酒醅中四甲基吡嗪的含量。人工合成菌群 1 和菌群 2 接种的大曲中四甲基吡嗪含量分别为 31.90 mg/kg 和 56.73 mg/kg, 比 CK 分别提高了 2.80、4.99 倍; 高温堆积发酵酒醅中人工合成菌群 1 和菌群 2 的四甲基吡嗪含量分别为 0.76 mg/kg 和 2.74 mg/kg, 比 CK 分别提高了 4.03 和 14.61 倍。以上结果表明, 人工合成菌群在定向调控大曲酶活性以及白酒中某些特定风味组分及含量等方面具有潜在的应用价值。

关键词 人工合成菌群; 高温大曲; 高通量测序; 理化指标; 挥发性物质; 四甲基吡嗪

中图分类号 TS261.1 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2024)04-0239-10

曲为酒之骨, 是白酒酿造的糖化发酵剂和生香剂。酒曲中含有白酒发酵所需的主要微生物及相应的酶, 在发酵过程中还会产生和积累多种风味物质^[1-2]。酒曲按照其制作工艺和发酵温度可分为高温大曲、中温大曲和中低温大曲。其中, 高温大曲主要用于酱香型白酒的酿造^[3-4]。大曲微生物种类繁多、来源广泛、组成复杂, 主要微生物为细菌、酵母菌和霉菌^[5]。芽孢杆菌对酱香风味和酱香风味前体物质的形成具有关键作用^[6-9]。酵母菌主要产生乙醇和其他醇类、醛类等风味物质^[10-11]。霉菌能产生糖化酶、酯化酶等多种酶类^[12], 主要起糖化和酯化等作用^[13]。传统高温大曲是通过接种上一批次的存留大曲(母曲)经自然发酵而生产的, 存在微生物群落组成复杂、菌群稳定性不够、产品所需的关键性风味组分及含量难以控制等缺点^[14]。

合成微生物群落是人工将 2 种或 2 种以上遗传背景完全解析的微生物通过共同培养而形成的微生物群体, 具有复杂度低、可控性强、稳定性好等优

点^[15-16]。Wang 等^[17]构建的清香型白酒人工菌群的发酵结果表明, 人工核心菌群对合成可重复的风味物质是有效的。Tang 等^[18]通过高通量测序揭示了发酵过程中大曲表面和核心微生物群落的结构特征, 探究了大曲物种多样性的原因。韩国强等^[19]的研究揭示了复配小曲白酒酿造发酵过程中微生物群落多样性及变化规律, 为复配小曲白酒的生产提供理论支持。曲冠颐^[20]利用人工构建的微生物组替代酒曲进行小曲清香型白酒发酵后, 合成微生物组生产的白酒中 15 种风味化合物产量提高, 原酒品质较酒曲发酵生产的原酒显著提升。

本研究将高温大曲中分离筛选的功能芽孢杆菌、嗜热真菌和酿酒酵母分别制成单一固态菌剂, 再按一定比例复配成人工合成菌群, 用人工合成菌群替代传统母曲制作高温大曲并进行实验室酿酒比较试验, 通过大曲的感官评价、理化指标、挥发性风味物质、微生物群落及实验室酿酒等进行分析比较, 旨在为人工合成菌群在大曲中的应用提供一定的理论基础。

收稿日期: 2024-05-09

基金项目: 武汉轻工大学校企合作项目(whpu-2020-kj-009)

郭小龙, E-mail: 1959617187@qq.com

通信作者: 缪礼鸿, E-mail: miaowhpu@126.com

1 材料与方法

1.1 试验菌种及材料

地衣芽孢杆菌(*Bacillus licheniformis*)BL44:分离自某高温大曲,为本研究筛选的1株产酱香味突出的功能芽孢杆菌;酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)SCY62、嗜热子囊菌(*Thermoascus crustaceus*)TC1、微小根毛霉(*Rhizomucor pusillus*)RP1和宛氏拟青霉(*Paecilomyces variotii*)PV3:为笔者所在实验室分离和保藏^[21];小麦、高粱、传统高温大曲母曲:由湖北白云边酒业股份有限公司提供。

1.2 试剂、仪器与设备

可溶性淀粉、糊精、无水乙醇、氯化钠、碘、氢氧化钠、酒石酸钾钠、醋酸钠、醋酸、无水葡萄糖:国药集团有限公司;碘化钾、硫酸铜、亚铁氰化钾、次甲基蓝:天津市天力化学试剂有限公司。

MB35快速水分测定仪:美国Ohaus公司;ST2100型pH计:奥豪斯仪器(常州)有限公司;DVB/CAR/PDMS三相固相微萃取头:美国Supelco公司;7890B气相色谱-质谱联用仪:美国安捷伦科技有限公司。

1.3 单一固体菌剂及人工合成群落的制备

菌株BL44种子液采用LB培养基,180 r/min,37℃培养16 h备用;菌株SCY62采用种子液YPD培养基,180 r/min,28℃培养24 h备用;菌株TC1、RP1及PV3采用YPD培养基,180 r/min,37℃培养48 h备用。将小麦粉碎并加水混合至含水量29%,分装于三角瓶中,115℃下灭菌30 min。灭菌冷却后按2.5%(m/m)的接种量将培养好的各种子液分别接入

三角瓶中并搅拌均匀,地衣芽孢杆菌、酿酒酵母和3株嗜热真菌(嗜热子囊菌、微小根毛霉、宛氏拟青霉)菌剂分别置于37、28和40℃恒温培养箱培养72 h,期间每隔24 h摇晃振荡三角瓶,确保培养基疏松。发酵完成后,各单一固体菌剂置45℃烘箱烘干至水分12%~15%,经粉碎后放置4℃冰箱保存备用。将各单一固体菌剂按活菌数比例混合后,制成人工合成群落。

1.4 嗜热真菌酶活测定

测定方法参照文献[22-23]及GB/T 23527.1—2023《酶制剂质量要求第1部分:蛋白酶制剂》。

1.5 高温大曲的制备

称取900 g的小麦,加5%的沸水,润粮30 min后将小麦粉碎(粉碎度在30%左右),粉碎后添加接种剂(传统母曲接种45 g,人工合成菌群按照活菌数 1.0×10^6 个/10 g接种45 g)搅拌均匀,加水继续搅拌将水分控制在37%左右,结束后放入制曲磨具踩压均匀,脱模后阴干12 h。之后放入培养箱,通过恒温培养箱人工调节温度,模拟曲房高温大曲发酵过程,共发酵45 d(30℃发酵1 d、35℃发酵1 d、40℃发酵0.5 d、45℃发酵0.5 d、50℃发酵1 d、55℃发酵2 d、60℃发酵3 d、55℃发酵2 d、50℃发酵3 d、45℃发酵3 d、40℃发酵4 d、35℃发酵7 d、30℃发酵至结束)。并在第1周、第2周进行曲块翻面,观察曲块变化并闻香,结束后进行相关后续试验。发酵过程中不添加稻草。根据先前对传统高温大曲中主要功能微生物的种类和数量的检测结果^[24]以及对特定微生物的功能研究需要,本研究设计2种人工合成菌群组合方案(表1)。

表1 处理组大曲接种剂的组成

Table 1 Composition of Daqu inoculum in the treatment group

组别 Groups	接种剂种类及比例 Inoculum types and proportions
CK(传统高温大曲) CK (Traditional high-temperature Daqu)	接种传统母曲5%(m/m)
人工合成菌群1 Synthetic microbial community 1	地衣芽孢杆菌BL44:霉菌(嗜热子囊菌TC1:微小根毛霉RP1:宛氏拟青霉PV3=1:5:1):酿酒酵母SCY62=10 ³ :10 ² :1(m/m)
人工合成菌群2 Synthetic microbial community 2	地衣芽孢杆菌BL44:霉菌(嗜热子囊菌TC1:微小根毛霉RP1=1:1):酿酒酵母SCY62=10 ³ :10 ² :1(m/m)

1.6 高温大曲感官评价

大曲感官检测打分详情见表2,评分人员由5名专业的大曲质检员进行评价,然后去掉一个最高分,去掉一个最低分后计数平均值,平均值为最后大曲的感官评价得分。

1.7 高温大曲微生物群落分析及理化指标检测

使用Illumina平台进行宏基因组测序。水分、酸度、液化力、糖化力及发酵力参照QB/T 4257—2011《酿酒大曲通用分析方法》进行测定。

表2 高温大曲感官检测标准表

Table 2 Sensory testing standards for high-temperature Daqu

样品 Samples	评分 Scoring criteria	外观(20分) Appearance (20 points)	曲香(40分) Aroma (40 points)	断面(40分) Cross-section (40 points)
高温优级大曲 High-quality high-temperature Daqu	>90	多为棕黄色,穿衣好,表面光洁且无裂口	有浓厚的复合曲香味且无异味	断面整齐呈灰白色,菌丝生长丰满,泡气性好
高温中级大曲 Medium-quality high-temperature Daqu	70~90	多为灰白色,穿衣略差,表面欠光滑	曲香较浓或有酱香味,无明显异味	断面较整齐,少量菌斑,泡气性较好
高温普级大曲 Ordinary-quality high-temperature Daqu	<70	灰白或小麦本色,穿衣差,表面粗糙或有杂菌菌斑	曲香味淡薄,有霉味和土腥味等异味	断面不整齐,霉变,生心,泡气性差

1.8 高温大曲实验室酿酒方法

将新鲜高粱用90℃热水浸泡过夜,蒸煮150 min后,摊凉至30℃接种高温大曲,接种量为高粱干质量的14%。用恒温培养箱模拟高温堆积发酵,发酵温度第1天28℃、第2天37℃、第3天42℃,堆积发酵完成后,装入灭菌的玻璃发酵瓶中,每组样品各装3瓶,28℃恒温发酵30 d。

1.9 高温大曲及酒醅中挥发性物质检测

样本预处理参照王雪山^[25]方法。挥发性物质使用顶空固相微萃取-气质联用技术检测,检测方法参照文献^[26]进行。

1.10 数据处理

使用BLASTP将非冗余基因集的氨基酸序列与NR数据库进行比对,获得物种在属分类学水平上的物种注释信息,使用R软件绘制群落组成图。其他

数据统计分析均使用SPSS 23.0软件进行,并采用单因素方差分析比较均值, $P<0.05$ 表示数据具有显著性差异;利用Origin 2019软件绘制挥发性成分聚类热图。所有样品重复测定3次,结果用“平均值±标准差”表示。

2 结果与分析

2.1 嗜热子囊菌、宛氏拟青霉及微小根毛霉的酶活性

表3为嗜热子囊菌、宛氏拟青霉、微小根毛霉的酶活性测定结果。由表3结果可知,微小根毛霉具有很强的淀粉酶活力,其活力高达1 434.05 U/g。宛氏拟青霉的糖化酶活力最高,为2 856.06 U/g。嗜热子囊菌中性蛋白酶活力和酸性蛋白酶活力最高,分别为13.96、6.73 U/g。

表3 菌株酶活性测定结果

Table 3 Results of enzyme activity of strains

菌株 Strains	淀粉酶 Amylase	糖化酶 Glucoamylase	中性蛋白酶 Neutral protease	酸性蛋白酶 Acid protease	纤维素酶 Cellulase	酯化酶 Esterase
宛氏拟青霉 PV3	291.95±2.60b	2 856.06±1.34a	8.64±0.20a	4.98±0.01a	8.04±0.06c	28.85±0.21b
微小根毛霉 RP1	1 434.05±0.78a	1 612.81±2.28b	9.18±0.04a	5.07±0.07a	4.29±0.13a	23.33±0.13a
嗜热子囊菌 TC1	32.74±0.75c	1 502.19±0.55c	13.96±0.44b	6.73±0.24b	7.48±0.10b	22.73±0.40a

注:同列标注的不同字母表示差异显著($P<0.05$),相同字母表示差异不显著($P>0.05$)。下同。Note: Different letters in the same column indicate significant differences ($P<0.05$), while the same letters indicate no significant differences ($P>0.05$). The same as below.

2.2 固体菌剂挥发性物质测定结果

采用小麦粉培养的5种单一固态菌剂的挥发性产物的HS-SPME-GC-MS检测结果如表4所示。共检出33种主要挥发性物质,其中酯类化合物5种、酸类化合物12种、醇类化合物8种、醛类化合物5种及其他类3种。挥发性物质中种类及总含量最多的是BL44,其中地衣芽孢杆菌BL44菌株产四甲基吡嗪能力最强,含量达到109.22 mg/kg,而其他4株真菌仅产生微量的四甲基吡嗪。

2.3 高温大曲感官评价结果

根据高温大曲感官检测标准表,CK和人工合成菌群2的表面均光滑,呈小麦色。CK曲香寡淡且有轻微异味,菌丝生长较差;人工合成菌群2菌丝生长不明显但有十分浓厚的复合曲香且无异味。故感官评分在70~90分,鉴定为高温中级大曲。人工合成菌群1的表面较光滑,呈棕黄色,穿衣好,有较浓的曲香且无异味,断面呈现灰白色且较整齐,菌丝生长较为明显,泡气性好。故感官评分在90分以上,鉴定为高优级大曲。具体情况见表5。

表4 单一固态菌剂挥发性成分

Table 4 Volatile components of a single solid state microbial agents

mg/kg

化合物名称 Compound names	未接种 Uninoculated	PV3	RP1	TC1	BL44	SCY62
正丙醇 1-Propanol	14.36±1.81	0.66±0.09	5.08±1.68	0.49±0.24	21.70±23.48	0.63±0.16
异丁醇 Isobutanol	ND	ND	1.44±1.25	ND	0.10±0.14	0.01±0.02
正戊醇 1-Pentanol	0.18±0.03	0.10±0.04	0.67±0.22	0.33±0.39	0.15±0.16	0.08±0.06
正己醇 1-Hexanol	0.18±0.02	0.29±0.09	0.37±0.10	0.49±0.03	0.11±0.00	0.24±0.03
正辛醇 1-Octanol	0.11±0.01	0.50±0.44	0.24±0.17	0.30±0.10	0.18±0.12	0.27±0.09
2,3-丁二醇 2,3- Butanediol	ND	ND	ND	ND	139.45±105.20	ND
糠醇 Furfuryl alcohol	0.55±0.01	0.27±0.38	0.25±0.01	0.51±0.06	0.28±0.02	0.45±0.15
3-甲硫基丙醇 3-Methylthiopropanol	0.07±0.00	0.10±0.00	0.13±0.05	0.08±0.02	0.14±0.01	0.07±0.00
乙酸 Acetic acid	11.18±0.61	16.40±7.71	15.74±5.34	12.57±0.17	129.83±118.98	11.93±1.70
异丁酸 Isobutyric acid	12.02±0.72	52.1±34.07	35.4±19.02	30.05±18.38	257.51±112.49	35.99±8.11
丁酸 Butyric acid	7.11±0.03	7.07±0.04	7.16±0.11	7.07±0.03	10.85±0.56	7.29±0.20
3-甲基丁酸 3-Methylbutyric acid	16.63±0.25	16.66±0.29	17.27±0.29	16.35±0.07	123.43±38.47	19.65±1.84
戊酸 Valeric acid	1.53±0.01	1.51±0.04	1.56±0.09	1.48±0.01	1.75±0.05	1.48±0.02
3-甲基戊酸 3-Methylvaleric acid	1.19±0.00	1.19±0.00	1.19±0.01	1.19±0.00	1.60±0.03	1.19±0.00
4-甲基戊酸 4-Methylvaleric acid	ND	ND	0.01±0.00	0.01±0.01	3.55±0.95	ND
己酸 Hexanoic acid	3.89±0.06	3.98±0.62	4.41±0.90	3.64±0.07	3.75±0.06	3.63±0.24
辛酸 Octanoic acid	0.24±0.00	0.24±0.02	0.24±0.01	0.23±0.00	0.24±0.01	0.24±0.01
苯甲酸 Benzoic acid	0.91±0.11	0.32±0.16	0.32±0.17	0.31±0.18	0.72±0.35	0.33±0.13
月桂酸 Lauric acid	ND	0.15±0.00	0.16±0.01	0.14±0.00	0.14±0.00	ND
十四酸 Tetradecanoic acid	0.14±0.00	0.17±0.07	0.16±0.08	0.13±0.04	0.20±0.06	0.14±0.05
乙酸丙酯 Ethyl acetate	0.01±0.00	ND	0.01±0.01	ND	0.28±0.35	0.01±0.01
丁酸乙酯 Butyl acetate	1.15±0.00	1.14±0.00	1.20±0.07	1.14±0.00	1.15±0.00	1.14±0.00
十四酸乙酯 Ethyl tetradecanoate	ND	0.21±0.01	0.23±0.01	0.15±0.04	ND	ND
葫芦巴内酯 Coumarin	ND	0.54±0.29	0.03±0.04	0.48±0.68	0.84±0.04	ND
十六酸乙酯 Ethyl hexadecanoate	ND	1.06±0.94	2.70±0.81	0.24±0.33	ND	ND
2,3-丁二酮 2,3-Butanedione	ND	ND	ND	ND	28.25±14.85	ND
羟基丙酮 Hydroxyacetone	ND	ND	ND	ND	0.54±0.77	ND
异戊醛 Isovaleraldehyde	ND	ND	0.04±0.02	0.07±0.04	1.26±0.27	0.04±0.04
香草醛 Vanillin	0.52±0.02	1.50±0.09	1.65±0.41	1.04±0.47	0.72±0.16	0.27±0.38
乙偶姻 Eugenol	90.67±3.72	97.89±31.85	103.77±18.73	91.55±36.86	3 696.79±3 087.36	95.62±26.18
四甲基吡嗪 Tetramethylpyrazine	ND	0.63±0.54	0.52±0.47	0.32±0.14	109.22±19.30	0.57±0.40
愈创木酚 Curcumin	ND	ND	ND	ND	0.2±0.04	ND
苯酚 Phenol	ND	ND	ND	ND	0.52±0.03	ND
挥发性物质总量 Total volatile compounds	162.63±3.91	204.70±55.80	201.95±28.30	170.37±57.10	4 535.43±3 484.26	181.26±33.21

注:ND表示未检测出。Note: ND indicates not detected.

2.4 高温大曲理化指标测定结果

高温大曲理化指标测定结果如表6所示,从含水量、酸度、液化力、糖化力及发酵力分析,3种大曲均具有显著差异($P<0.05$)。含水量最高的是接种人工合成菌群1制作的大曲。酸度最高的是CK。接种

人工合成菌群2的曲块发酵力最高,为0.64 U/g,是CK的1.28倍。糖化力和液化力均是接种人工合成菌群制作曲块的高,其中接种人工合成菌群1的曲块糖化力及液化力分别是330、1.86 U/g,比CK分别提高了5.89和46.5倍。接种人工合成菌群2的曲块糖

表5 高温大曲感官得分

Table 5 Sensory scores of high-temperature Daqu

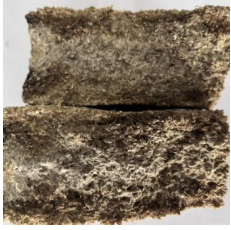

组别 Groups	CK(传统母曲) CK (Traditional Daqu)	人工合成菌群1 Synthetic microbial community 1	人工合成菌群2 Synthetic microbial community 2
断面 Cross-section			
描述 Description	表面光滑,呈小麦色,穿衣好。曲香寡淡且有轻微异味。断面棕黄色,菌丝生长较差,具有良好的泡气性。	表面较光滑,呈棕黄色,穿衣好,有较浓的曲香且无异味,断面灰白色较整齐,菌丝生长较为明显,泡气性好。	表面光滑,呈小麦色,穿衣差,有十分浓厚的复合曲香且无异味,断面较整齐,但菌丝生长不明显,有少量菌斑,泡气性好。
得分 Score	86.00±2.65	93.00±1.73	89.00±1.73

表6 大曲理化指标

Table 6 Physicochemical indexes of Daqu

组别 Groups	含水量/% Moisture content	酸度/(mmol/10 g) Acidity	糖化力/(U/g) Saccharifying power	发酵力/(U/g) Fermenting power	液化力/(U/g) Liquefying power
CK(传统母曲) CK (Traditional Daqu)	5.94±0.14b	2.33±0.13a	56.00±1.00c	0.50±0.01b	0.04±0.00b
人工合成菌群1 Synthetic microbial community 1	7.57±0.12a	0.92±0.04c	330.00±4.00a	0.14±0.02c	1.86±0.21a
人工合成菌群2 Synthetic microbial community 2	5.21±0.14c	1.47±0.07b	100.00±3.00b	0.64±0.03a	0.20±0.02c

化力及液化力分别是100、0.2 U/g,比CK分别提高了1.79和5.00倍。

2.5 基于属水平的微生物群落分析

基于属水平的微生物群落结果如图1所示。在真菌属水平上,CK、人工合成菌群1、人工合成菌群2微生物群落数分别为396、481、220种,CK中优势真菌属为 *Lichtheimia*、*Circinella*、*Syncephalastrum*,接种人工合成菌群1的大曲中优势真菌属为 *Lichtheimia*、*Circinella*、*Rasamsonia*,接种人工合成菌群2的大曲中优势真菌属为 *Lichtheimia*、*Circinella*、*Syncephalastrum*。在细菌属水平上,CK、人工合成菌群1、人工合成菌群2微生物群落数分别为315、349、230种,CK中优势细菌属为 *Bacillus*、*Staphylococcus*、*Pediococcus*,接种人工合成菌群1的大曲中优势细菌属为 *Bacillus*、*Staphylococcus*、*Saccharopolyspora*,接种人工合成菌群2的大曲中优势细菌属为 *Bacillus*、*Staphylococcus*、*Proteu*。

2.6 大曲及酒醅挥发性风味物质分析

大曲挥发性物质检测结果如图2A所示,共检测出78种挥发性风味物质。其中,人工合成菌群制作的大曲挥发性化合物种类均为69种,接种传统母曲

的挥发性化合物种类为68种。其中接种人工合成菌群2的曲块挥发性物质含量最高,为855.40 mg/kg,是CK的1.95倍。CK、人工合成菌群1和菌群2大曲中的乙偶姻含量分别为12.27、20.27、506.90 mg/kg,相比于CK,人工合成菌群1和菌群2的大曲分别提高了1.65和4.13倍。此外,接种人工合成菌群制作大曲也可提高大曲中四甲基吡嗪含量。CK、人工合成菌群1和菌群2大曲中四甲基吡嗪含量分别为11.36、31.90、56.73 mg/kg,相比于CK,接种人工合成菌群1和菌群2分别提高了2.80和4.99倍。

大曲接种新鲜高粱高温堆积发酵1个月后,用气相色谱-质谱联用仪检测酒醅挥发性物质。结果如图2B所示,共检测出71种挥发性风味物质。CK、人工合成菌群1和菌群2发酵的酒醅中分别检测出50、66和54种挥发性物质。就种类来看,接种人工合成菌群制作的大曲提高了发酵酒醅中挥发性物质的种类。总挥发性物质含量最高的酒醅是接种人工合成菌群1曲块发酵的,为2183.51 mg/kg。此外,接种人工合成菌群1和菌群2发酵的酒醅中四甲基吡嗪的含量分别为0.76、2.74 mg/kg,比CK发酵的酒醅产量分别提高了4.03和14.61倍。

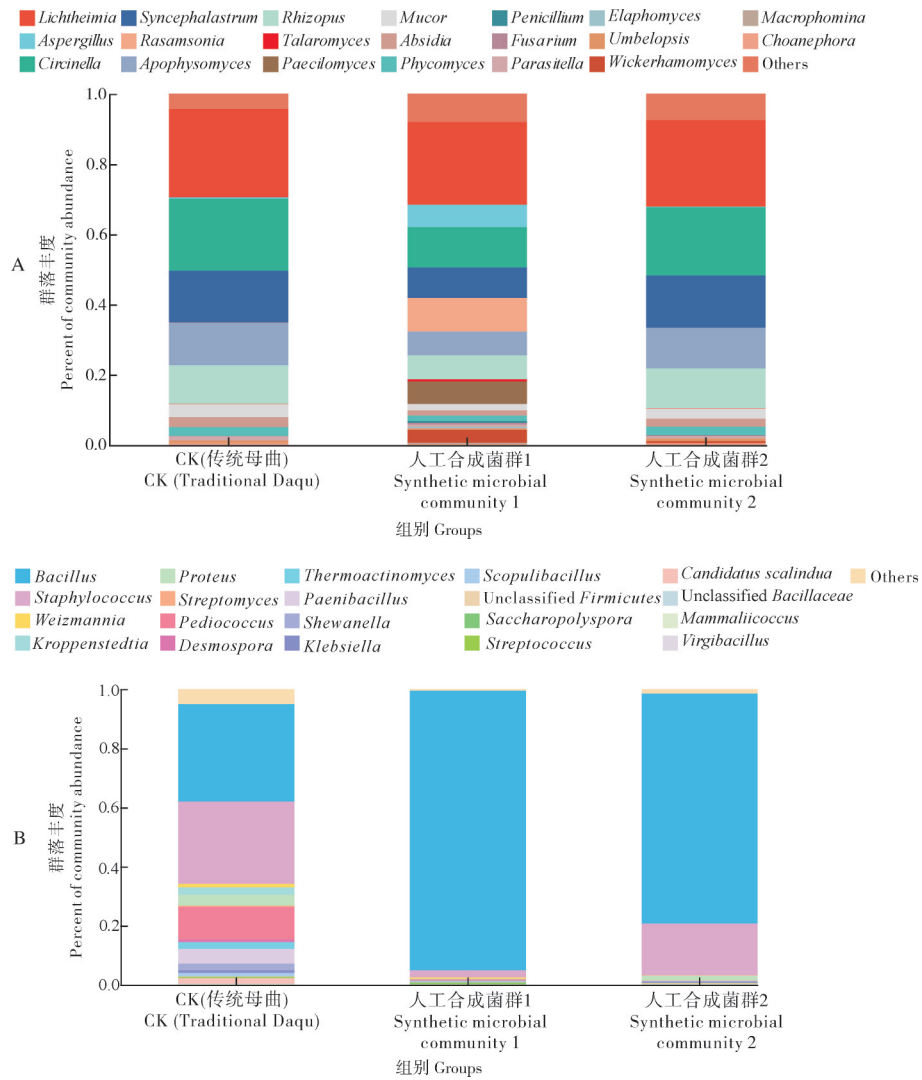


图1 基于属水平大曲的真菌(A)和细菌(B)群落结构

Fig.1 Composition of microbial community of fungi (A) and bacteria (B) at genus level in Daqu

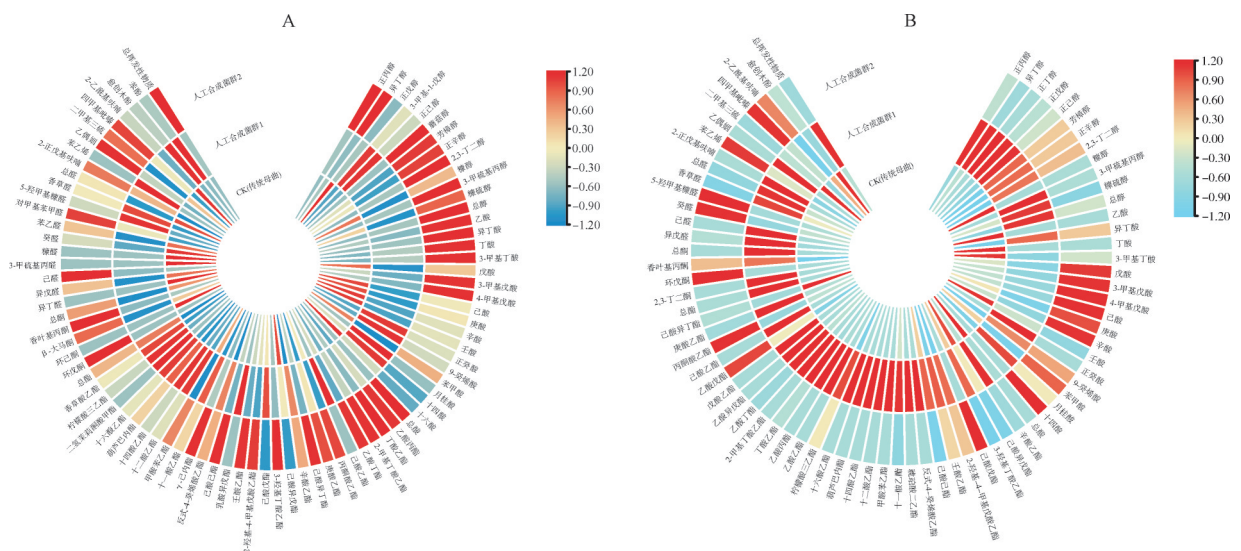


图2 大曲(A)和酒醅(B)中挥发性风味物质含量热图

Fig.2 Heat map of volatile flavor compounds in Daqu (A) and fermented grains (B)

3 讨论

嗜热真菌中的宛氏拟青霉、微小根毛霉、嗜热子囊菌为高温大曲及酿造系统中的优势真菌^[24,27]。本研究利用小麦为原料,将高温大曲中分离筛选的地衣芽孢杆菌、酿酒酵母、宛氏拟青霉、微小根毛霉和嗜热子囊菌分别制备成固态菌剂并按比例构建人工合成菌群。采用人工合成菌群替代传统母曲制作高温大曲试验结果表明,接种人工合成菌群2的曲块发酵力最高,是CK曲块的1.28倍。糖化力和液化力均是接种人工合成菌群制作的曲块高,其中接种人工合成菌群1的曲块糖化力是CK的5.89倍,液化力是CK的46.50倍,这可能与人工合成菌群1中含有宛氏拟青霉有关,供试的3株嗜热真菌中宛氏拟青霉的糖化酶活性最高,同时其淀粉酶活性也较高。接种人工合成菌群2的曲块糖化力和液化力分别是CK的1.79和5.00倍。酶活性高低可影响大曲的理化指标^[28],高温大曲的液化力、糖化力、发酵力是检测其品质的重要指标^[29]。本研究结果显示,可通过选择具有不同酶活特性和不同菌群组成的人工合成菌群来实现对高温大曲的液化力和糖化力等性状的精准调控。对制作的大曲进行属水平的微生物群落结构分析,发现3种大曲的优势真菌属为 *Lichtheimia*, 优势细菌属为 *Bacillus*。以人工合成菌群为接种剂制作的高温大曲的微生物种类也很丰富,这与制作大曲的原料小麦本身携带微生物及相对开放的发酵环境有关^[30]。

从接种传统母曲的曲块和2种人工合成菌群的高温大曲曲块中分别检测出68和69种挥发性物质成分。其中接种人工合成菌群2的曲块的挥发性物质含量最高,是CK的1.95倍。挥发性物质中的乙偶姻和四甲基吡嗪是白酒风味的重要组成成分^[31],其中四甲基吡嗪也是白酒行业公认的“健康因子”^[32-34]。接种人工合成菌群制作大曲可显著提高乙偶姻和四甲基吡嗪的含量。与CK相比,接种人工合成菌群1和菌群2大曲曲块的乙偶姻含量分别提高了1.65和4.13倍,四甲基吡嗪含量分别提高了2.80和4.99倍。

将CK、人工合成菌群1和菌群2制作的高温大曲分别用于高温堆积发酵,从发酵酒醅中分别检测出50、66和54种挥发性物质。其中接种人工合成菌群1曲块发酵酒醅的醇类、酸类、酯类、酮类和醛类物质含量最高。酯类物质能为白酒提供花香与果香,

酸类物质能稳定香气,醇类物质、醛类物质对白酒风味层次具有贡献作用^[35-36]。此外,与CK相比,人工合成菌群1和菌群2发酵酒醅的四甲基吡嗪含量分别提高了4.03和14.61倍,表明人工合成菌群替代传统母曲制作的高温大曲可显著提高酒醅中四甲基吡嗪含量。

综上,本研究采用3株嗜热真菌(宛氏拟青霉、微小根毛霉、嗜热子囊菌)、1株酿酒酵母和1株地衣芽孢杆菌构建了一种精简的人工合成菌群。采用人工合成菌群替代传统母曲进行的实验室规模的高温大曲制备结果表明,接种人工合成菌群的高温大曲液化力和糖化力均比接种传统母曲的对照组有显著提高,同时人工合成菌群能显著提高大曲及酒醅中四甲基吡嗪的含量。表明人工合成菌群在定向调控大曲酶活性以及白酒中某些特定风味组分及含量等方面具有潜在的应用价值。

参考文献 References

- [1] WANG B W, WU Q, XU Y, et al. Synergistic effect of multiple saccharifying enzymes on alcoholic fermentation for Chinese Baijiu production [J/OL]. Applied and environmental microbiology, 2020, 86 (8): e00013-e00020 [2024-05-09]. <https://doi.org/10.1128/aem.00013-20>.
- [2] LIU H L, SUN B G. Effect of fermentation processing on the flavor of Baijiu [J]. Journal of agricultural and food chemistry, 2018, 66(22): 5425-5432.
- [3] 沈怡方. 白酒生产技术全书 [M]. 北京: 中国轻工业出版社, 2015. SHEN Y F. Complete book of liquor production technology [M]. Beijing: China Light Industry Press, 2015 (in Chinese).
- [4] 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 prokaryotic microbial community and the flavor components in the storage process of Daqu [J]. Microbiology China, 2017, 44(2): 384-393 (in Chinese with English abstract).
- [5] 梁敏华, 赵文红, 白卫东, 等. 白酒酒曲微生物菌群对其风味形成影响研究进展 [J]. 中国酿造, 2023, 42(5): 22-27. LIANG M H, ZHAO W H, BAI W D, et al. Research progress on the influence of microbial flora of Baijiu Jiuqu on flavor formation [J]. China brewing, 2023, 42(5): 22-27 (in Chinese with English abstract).
- [6] LI H D, LIU S Y, LIU Y B, et al. Functional microorganisms in Baijiu Daqu: research progress and fortification strategy for application [J/OL]. Frontiers in microbiology, 2023, 14: 1119675 [2024-05-09]. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1119675>.

- [7] TIAN N, GUO X, WANG M Z, et al. Bacterial community diversity of Shilixiang Baijiu Daqu based on metagenomics [J/OL]. *Journal of food biochemistry*, 2020: e13410 [2024-05-09]. <https://doi.org/10.1111/jfbc.13410>.
- [8] 谭壹, 晏培, 李冰冰, 等. 酱香型白酒功能微生物的应用研究进展[J]. *中国酿造*, 2024, 43(3): 1-5. TAN Y, YAN P, LI B B, et al. Research progress on the application of functional microorganisms in sauce-flavor Baijiu [J]. *China brewing*, 2024, 43(3): 1-5 (in Chinese with English abstract).
- [9] WANG J L, LU C S, XU Q, et al. Bacterial diversity and lactic acid bacteria with high alcohol tolerance in the fermented grains of soy sauce aroma type Baijiu in North China [J/OL]. *Foods*, 2022, 11(12): 1794 [2024-05-09]. <https://doi.org/10.3390/foods11121794>.
- [10] 汪慧慧, 高俊杰, 李庆腾, 等. 浓香型酒醅发酵过程中真核微生物群落的研究[J]. *食品科技*, 2022, 47(8): 14-20. WANG H H, GAO J J, LI Q T, et al. Study on eukaryotic community in fermented grains during strong-flavor Baijiu fermentation [J]. *Food science and technology*, 2022, 47(8): 14-20 (in Chinese with English abstract).
- [11] 刘薇, 栾春光, 王德良, 等. 高产酯酵母的筛选、鉴定及其发酵特性研究[J]. *食品与发酵工业*, 2021, 47(23): 311-318. LIU W, LUAN C G, WANG D L, et al. Screening, identification and fermentation characteristics of yeast with high-yield of ester [J]. *Food and fermentation industries*, 2021, 47(23): 311-318 (in Chinese with English abstract).
- [12] 孙剑秋, 刘雯雯, 臧威, 等. 酱香型白酒酒醅中霉菌群落组成与功能酶活性[J]. *中国食品学报*, 2013, 13(8): 239-247. SUN J Q, LIU W W, ZANG W, et al. Community composition of moulds from fermented grains of Maotai-flavor liquor and their enzyme activities [J]. *Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology*, 2013, 13(8): 239-247 (in Chinese with English abstract).
- [13] 罗晶, 祝水兰, 王丽, 等. 浓香型白酒酿造微生物与风味物质组成的研究进展[J]. *中国酿造*, 2020, 39(4): 1-6. LUO J, ZHU S L, WANG L, et al. Research progress on the composition of brewing microorganisms and flavor substances in strong-flavor Baijiu [J]. *China brewing*, 2020, 39(4): 1-6 (in Chinese with English abstract).
- [14] DU R B, JIANG J, QU G Y, et al. Directionally controlling flavor compound profile based on the structure of synthetic microbial community in Chinese liquor fermentation [J/OL]. *Food microbiology*, 2023, 114: 104305 [2024-05-09]. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fm.2023.104305>.
- [15] 张小龙, 王嘉瑞, 李青卓, 等. 合成微生物群落及在发酵食品中应用研究进展[J]. *中国酿造*, 2021, 40(3): 17-21. ZHANG X L, WANG J R, LI Q Z, et al. Research progress of synthetic microbial community and its application in fermented food [J]. *China brewing*, 2021, 40(3): 17-21 (in Chinese with English abstract).
- [16] 杨旭, 宋丽丽, 张志平, 等. 合成微生物群落强化可控固态发酵体系的研究进展[J]. *可再生能源*, 2021, 39(8): 1013-1017. YANG X, SONG L L, ZHANG Z P, et al. Research progress of synthetic microbial community enhanced controllable solid-state fermentation system [J]. *Renewable energy resources*, 2021, 39(8): 1013-1017 (in Chinese with English abstract).
- [17] WANG S L, WU Q, NIE Y, et al. Construction of synthetic microbiota for reproducible flavor compound metabolism in Chinese light-aroma-type liquor produced by solid-state fermentation [J/OL]. *Applied and environmental microbiology*, 2019, 85(10): e03090-e03018 [2024-05-09]. <https://doi.org/10.1128/aem.03090-18>.
- [18] TANG J, RAO J Q, ZOU Y F, et al. The community assembly patterns determined differences between the surface and the core microbial communities of Nongxiangxing Daqu [J/OL]. *LWT*, 2023, 183: 114936 [2024-05-09]. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2023.114936>.
- [19] 韩国强, 孙协平, 吴鹏飞, 等. 基于高通量测序分析复配小曲白酒发酵过程中微生物群落结构及多样性[J]. *食品科学*, 2021, 42(18): 80-85. HAN G Q, SUN X P, WU P F, et al. High throughput sequencing-based analysis of microbial community structure and diversity during Baijiu fermentation with mixed-strain xiaoqu [J]. *Food science*, 2021, 42(18): 80-85 (in Chinese with English abstract).
- [20] 曲冠颐. 小曲清香型白酒合成微生物组的构建及应用[D]. 无锡: 江南大学, 2022. QU G Y. Construction and application of synthetic microbiota in light-aroma type Chinese liquor started by Xiaoqu [D]. Wuxi: Jiangnan University, 2022 (in Chinese with English abstract).
- [21] 邓灿. 兼香型白酒不同品级高温大曲的特性分析及优势嗜热真菌功能研究[D]. 武汉: 武汉轻工大学, 2022. DENG C. Characteristics of high-temperature daqu with different grades for Nongxiang-Jiangxiang Baijiu and the function of dominant thermophilic fungi [D]. Wuhan: Wuhan Polytechnic University, 2022 (in Chinese with English abstract).
- [22] 徐岩. 现代白酒酿造微生物学[M]. 北京: 科学出版社, 2019. XU Y. *Microbiology of modern liquor brewing* [M]. Beijing: Science Press, 2019 (in Chinese).
- [23] 金伟. 耐高温产纤维素酶真菌的筛选及产酶特性研究[D]. 武汉: 武汉工业学院, 2012. JIN W. Research on the screening cellulase-producing fumigatus strain and the conditions of cellulase producing [D]. Wuhan: Wuhan Polytechnic University, 2012 (in Chinese with English abstract).
- [24] 吴正坤, 刘蒲临, 杨团元, 等. 不同贮存期高温大曲微生物群落演替与理化指标相关性分析[J]. *中国酿造*, 2023, 42(7): 160-166. WU Z K, LIU P L, YANG T Y, et al. Correlation analysis of microbial community succession and physicochemical properties of Daqu in different storage periods [J]. *China brewing*, 2023, 42(7): 160-166 (in Chinese with English abstract).

- tract).
- [25] 王雪山.不同环境清香类型白酒发酵微生物种群结构比较及溯源解析[D].无锡:江南大学,2018.WANG X S.Microbial community structure and microbial source tracking of chinese light-flavor liquor fermentation in different environments [D]. Wuxi: Jiangnan University, 2018 (in Chinese with English abstract).
- [26] 张荣.地衣芽孢杆菌固态发酵产地衣素及风味活性物质对白酒品质的影响[D].无锡:江南大学,2014.ZHANG R.The influence of lichenysin and aroma-active compounds by *Bacillus licheniformis* in solid-state fermentation on quality of Chinese liquor [D]. Wuxi: Jiangnan University, 2014 (in Chinese with English abstract).
- [27] LIU P L, MIAO L H. Multiple batches of fermentation promote the formation of functional microbiota in Chinese miscellaneous-flavor Baijiu fermentation [J/OL]. *Frontiers in microbiology*, 2020, 11: 75 [2024-05-09]. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00075>.
- [28] 印丽,邱树毅,曹文涛,等.酱香型白酒核心产区大曲的酶系分析[J].现代食品科技,2021,37(3):89-96.YIN L, QIU S Y, CAO W T, et al. Analysis of Daqu enzymes from the core production area of Maotai-flavor liquor [J]. *Modern food science and technology*, 2021, 37(3): 89-96 (in Chinese).
- [29] 向港兴,陈莹琪,沈毅,等.不同等级浓香型大曲微生物群落结构与理化性质的比较分析[J].食品科学,2022,43(18):184-191.XIANG G X, CHEN Y Q, SHEN Y, et al. Comparative analysis of microbial community structure and physico-chemical properties of different grades of nongxiangxing Daqu [J]. *Food science*, 2022, 43(18): 184-191 (in Chinese with English abstract).
- [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 with English abstract).
- [31] 黄蕴利,黄永光,郭旭.白酒中的主要生物活性功能成分研究进展[J].食品工业科技,2016,37(15):375-379.HUANG Y L, HUANG Y G, GUO X. Bioactive functional components in Chinese liquor [J]. *Science and technology of food industry*, 2016, 37(15): 375-379 (in Chinese with English abstract).
- [32] ZHU B F, XU Y. Production of tetramethylpyrazine by batch culture of *Bacillus subtilis* with optimal pH control strategy [J]. *Journal of industrial microbiology & biotechnology*, 2010, 37(8): 815-821.
- [33] LIN J G, WANG Q Q, ZHOU S M, et al. Tetramethylpyrazine; a review on its mechanisms and functions [J/OL]. *Bio-medicine & pharmacotherapy*, 2022, 150: 113005 [2024-05-09]. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2022.113005>.
- [34] 谢国权,梁昕彤,张文先,等.四甲基吡嗪衍生物的合成及抗肿瘤活性研究[J].化学研究与应用,2019,31(2):308-313.XIE G Q, LIANG X T, ZHANG W X, et al. Study on synthesis and anti-tumor activities of ligustrazine derivatives [J]. *Chemical research and application*, 2019, 31(2): 308-313 (in Chinese with English abstract).
- [35] 王金龙,尹延顺,田栋伟,等.不同质量等级酱香白酒中风味物质及差异性分析[J].中国酿造,2024,43(1):41-49.WANG J L, YIN Y S, TIAN D W, et al. Analysis of flavor substances and differences of sauce-flavor Baijiu with different quality grades [J]. *China brewing*, 2024, 43(1): 41-49 (in Chinese with English abstract).
- [36] 张乃云,李学思.浅议白酒中的风味物质与感官分析[J].酿酒,2024,51(2):29-33.ZHANG N Y, LI X S. Discussion on flavor substances and sensory analysis of Baijiu [J]. *Liquor making*, 2024, 51(2): 29-33 (in Chinese with English abstract).

Effects of synthetic microbial communities replacing traditional Muqu on quality of high-temperature Daqu

GUO Xiaolong¹, DENG Can¹, ZHANG Mingchun², GAO Ruijie¹,
LIU Pulin¹, XIONG Lijun², MIAO Lihong¹

1.College of Life Science and Technology, Wuhan Polytechnic University, Wuhan 430023, China;
2.Hubei Baiyunbian Liquor Co. Ltd., Songzi 434200, China

Abstract Traditional high-temperature Daqu is produced by spontaneous fermentation, which has disadvantages including complex composition of microbial community and difficulty in controlling the components and content of required flavor. Wheat was used to prepare the solid microbial agents of *Bacillus licheniformis* BL44, *Saccharomyces cerevisiae* SCY62, *Paecilomyces variotii* PV3, *Rhizomucor pusillus* RP1 and *Thermoascus crustaceus* TC1 isolated and screened from the high-temperature Daqu to optimize the structure of microbial community in high-temperature Daqu and improve the quality of high-temperature Daqu. Two synthetic microbial communities were constructed with different addition ratios to replace the traditional Muqu (CK) in producing high-temperature Daqu. Brewing experiments in laboratory were conducted and analyzed. The results of high-throughput sequencing showed that the dominant fungal genus and the dominant bacterial genus of the three kinds of Daqu was *Lichtheimia* and *Bacillus*, respectively. The results of measuring the physicochemical indexes of the Daqu showed that the liquefaction and saccharification abilities of the high-temperature Daqu inoculated with the synthetic microbial communities were significantly improved compared to CK. The results of analyses with gas chromatography-mass spectrometry showed that inoculating synthetic microbial communities instead of traditional Muqu significantly increased the content of tetramethylpyrazine in Daqu and fermented grains. The content of tetramethylpyrazine in Daqu inoculated with synthetic microbial group 1 and microbial group 2 was 31.90 mg/kg and 56.73 mg/kg, increased by 2.80 and 4.99 times compared to that of CK. In the high-temperature stacked fermentation mash, the content of tetramethylpyrazine inoculated with synthetic microbial group 1 and microbial group 2 was 0.76 mg/kg and 2.74 mg/kg, increased by 4.03 and 14.61 times compared to that of CK. It is indicated that the synthetic microbial community has potential application in directionally regulating the activity of enzymes in Daqu and the components and contents of some specific flavors in Baijiu.

Keywords synthetic microbial community; high-temperature Daqu; high-throughput sequencing; physical and chemical indexes; volatiles substances; tetramethylpyrazine

(责任编辑:边书京)