

石斛添加量对小曲微生物及风味的影响

陈小琴, 母应春*, 苏伟, 姜丽, 赵驰

(贵州大学酿酒与食品工程学院 贵阳 550025)

摘要 为探究石斛茎对小曲微生物群落结构和挥发性风味物质的影响, 采用高通量测序技术和顶空固相微萃取结合气相色谱-质谱联用仪分析传统小曲(DZ)和 3 个石斛茎添加量的小曲(A、B 和 C)中微生物群落结构和挥发性风味物质。结果显示: DZ 与 A、B 和 C 微生物群落和挥发性风味物质存在明显差异。在属水平上, DZ 优势细菌属为 *uncultured_bacterium_o_Chloroplast*、*uncultured_bacterium_f_Mitochondria* 和乳酸杆菌属, 优势真菌属为根霉菌属和曲霉菌属。A、B 和 C 优势细菌属为芽孢杆菌属, 优势真菌属为根霉菌属、曲霉菌属和威克汉姆酵母属。芽孢杆菌、根霉菌和威克汉姆酵母属的相对丰度随石斛茎添加量的增加而增加, 当添加量为 50% 时不利于优势菌属生长。从 4 种小曲中共鉴定出 41 种挥发性组分, 筛选出 16 种显著差异挥发性组分(VIP > 1.0, $P < 0.05$), 其中, A(13 种)、B(15 种)、C(10 种)和 DZ(2 种), 通过正交偏最小二乘判别法分析得出 A 与 B 和 C 与 DZ 间差异较小。此外, 相关性分析表明优势菌属与理化性质间存在一定相关性, 同时与醇类、酚类及醛酮类物质呈正相关。研究发现添加 30% 石斛茎时小曲品质较好, 这为后续石斛小曲的功能应用提供理论依据。
关键词 石斛; 小曲; 微生物多样性; 挥发性风味; 相关性分析

文章编号 1009-7848(2022)12-0290-13 **DOI:** 10.16429/j.1009-7848.2022.12.029

酒曲是中国白酒酿造的糖化、发酵和生香剂, 含多种微生物和风味物质, 对酒的产率和品质有重要影响, 有“曲是酒之骨”之称^[1]。铁皮石斛(*Dendrobium officinale* Kimura et Migo)具有独特药用价值, 含石斛多糖、生物碱等多种活性成分, 具有抗癌、降血糖、增强免疫力等功效^[2]。制作酒曲时添加药食同源物质能抑制杂菌生长, 促进有益微生物繁殖, 还能丰富产品风味^[3]。吴志等^[4]在制曲时添加 3% 的石菖蒲、生地黄和白术等醇提液, 提高了曲发酵力和糖化力。禹晓婷等^[5]添加 12 味药食同源物质入曲, 发现新基质曲糖化力和液化力是传统曲的 1.3 倍和 2.8 倍。目前, 还未见将石斛茎作为小曲发酵基质的研究报道。

近年来, 高通量测序技术 (high-throughput sequencing, HTS) 在酒曲中广泛应用, 增强了人们对酒曲微生物群落结构及多样性的了解^[6]。同时, 常结合代谢组学技术研究食品中挥发性风味物质 (volatile flavor components, VFCs)。如 Zhao 等^[7]采用宏基因组学和 GC-TOF-MS 研究了贵州 3 种小曲微生物群落和风味物质, 结果显示乳酸杆菌属

(*Lactobacillus*)、芽孢杆菌属 (*Bacillus*)、曲霉属 (*Aspergillus*)、酿酒酵母属 (*Saccharomyces*) 等为小曲中优势菌属, 并筛选出 39 种显著差异代谢物。Tang 等^[8]利用 Illumina MiSeq 平台和气相色谱质谱联用仪 (Gas Chromatography-Mass Spectrometer, GC-MS), 检测 4 种小曲微生物群落和 VFCs, 发现葡萄球菌属 (*Staphylococcus*)、魏氏细菌属 (*Weissella*)、根霉菌属 (*Rhizopus*) 和念珠菌属 (*Candida*) 为优势菌属, 同时鉴定出 68 种显著差异的 VFCs。目前还没有关于石斛小曲品质的研究报道。

本研究以传统小曲和石斛小曲为研究对象, 采用 HTS 和顶空固相微萃取结合气相色谱-质谱联用技术 (Headspace Solid Phase Microextraction-GC-MS, HS-SPME-GC-MS) 分析石斛添加量对小曲微生物群落、挥发性风味物质及理化特性的影响, 为石斛小曲工艺优化和生产应用提供理论参考。

1 材料和方法

1.1 材料与试剂

石斛小曲原料为市售铁皮石斛茎, 产自贵州; 种曲为根霉菌 Q303, 贵州轻工研究所; 传统小曲未添加石斛, 编号为 DZ; 石斛小曲按石斛添加量

收稿日期: 2021-12-19

基金项目: 黔石科合[2019004]号

第一作者: 陈小琴, 女, 硕士生

通信作者: 母应春 E-mail: myc1886@163.com

30%,40%和 50%分别编号为 A,B 和 C。

Power Soil DNA 提取试剂盒,美国 MP Bio 公司;2%琼脂糖凝胶,西班牙 Biowest 公司;DNA 聚合酶,大连宝生物工程有限公司;正、反引物,深圳市英俊生物技术有限公司;MinElute PCR 纯化试剂盒,德国 Qiagen 公司;正构烷烃(色谱纯),美国 Sigma 公司;环己酮(>99.5%,GC),上海阿拉丁生物科技股份有限公司。

1.2 仪器

ABI Veriti™99012PCR 仪,美国 ABI 公司; Gel Doc 2000 型凝胶成像仪,美国 Bio-Rad 公司;

Illumina Hiseq 测序仪,美国 Illumina 公司;GC-MS TSQ8000 与 TRACE1300 气-质谱联用,美国赛默飞世尔科技公司;50/30 μm/CAR/PDMS/DVB 萃取头,美国安捷伦公司。

1.3 方法

1.3.1 样品制备与采集 参照禹晓婷等^[9]的方法并稍作修改制备小曲。所有样品装入无菌袋中,密封,置于-80℃超低温冰箱,用于理化特性、VFCs 和微生物检测。

工艺流程:

根霉菌 Q303



石斛茎→粉碎→润料→常压灭菌 0.5 h→焖料 1.0 h→降温并打散→拌料→三角瓶恒温培养→24 h 后扣瓶 1 次→恒温培养 24 h→培曲完成→低温干燥→密封保存。

1.3.2 理化指标检测 小曲水分、酸度、液化力、糖化力、发酵力和酯化力等检测参考文献^[9]。

1.3.3 挥发性风味检测

1.3.3.1 GC-MS 条件 进样口温度:240℃;升温程序:40℃(5 min),5℃/min 上升到 150℃(3 min),最后以 5℃/min 上升到 240℃(5 min)。以高纯氦气(99.999%)为载气,载气流速 1.00 mL/min,不分流进样。

质谱条件:EI 离子源,离子源温度 250℃,电离电压 70 eV,传输线温度 240℃,色谱扫描范围 35~550 amu。

1.3.3.2 定性及定量方法 与质谱 NIST 光谱数据库比对并鉴定,仅保留正、反匹配度大于 700 的化合物。通过内标法计算得到各挥发性组分的质量浓度。计算公式如下:

$$C_i = \frac{C_{is} \times A_i}{A_{is}} \quad (1)$$

式中: C_i ——待测挥发性组分质量浓度,μg/kg; C_{is} ——内标质量浓度,μg/mL; A_i ——待测挥发性组分的色谱峰面积,mAU·min; A_{is} ——内标的色谱峰面积,mAU·min。

1.4 数据分析

用 SPSS Statistics 26.0 软件统计分析数据;

SIMCA14.1 软件绘制用于正交偏最小二乘判别得分图,Origin 2018 软件用于绘制微生物群落组成图和主成分分析图、层级聚类图,R 语言软件用于绘制 VFCs 热图、微生物与 VFCs 相关性热图,Canoco 5 软件绘制冗余分析图。

2 结果与分析

2.1 小曲理化性质

由表 1 可知,4 种小曲水分含量在 11.42%~12.52%之间,差异不显著($P>0.05$),均小于国家标准的 13%,利于长期储存^[10]。添加 30%石斛茎时,糖化力、液化力和发酵力最大值分别为(122.40 ± 0.61), (51.87 ± 8.67)U/g 和 (13.97 ± 2.00)g/100 g;然而,酯化力在 40%添加量时最大值(169.38 ± 6.71)mg/g。糖化力和发酵力分别反映微生物将原料中的淀粉转化为可发酵性糖的能力及将其转化成乙醇的能力^[11-12];酯化力与白酒发酵过程中酯类物质的形成密切相关^[13]。此外,酸度是评价酒曲成熟度的一个重要指标^[14],且随石斛添加量的增加而增大,在添加量为 50%时最大值(0.82 ± 0.03)mmol/10 g。综上所述,较 DZ 而言,添加 30%石斛茎时小曲的理化品质最佳。

表1 小曲样品理化性质分析

Table 1 Analysis of physicochemical properties in Xiaoqu samples

样品	水分含量/%	酸度/ mmol·(10 g) ⁻¹	糖化力/ U·g ⁻¹	液化力/ U·g ⁻¹	发酵力/ g·(100 g) ⁻¹	酯化力/ mg·g ⁻¹
A	11.43 ± 1.02 ^a	0.30 ± 0.05 ^c	122.40 ± 0.61 ^a	51.87 ± 8.67 ^a	23.97 ± 2.00 ^a	130.30 ± 6.71 ^{ab}
B	12.52 ± 0.92 ^a	0.57 ± 0.02 ^b	102.93 ± 0.15 ^b	48.71 ± 4.29 ^a	13.32 ± 1.15 ^b	169.38 ± 10.11 ^b
C	11.42 ± 0.14 ^a	0.82 ± 0.03 ^a	91.07 ± 2.50 ^c	39.57 ± 1.65 ^a	7.32 ± 0.58 ^c	66.82 ± 20.08 ^b
DZ	12.39 ± 1.22 ^a	0.44 ± 0.02 ^c	102.27 ± 0.93 ^b	45.93 ± 3.98 ^a	21.97 ± 1.00 ^a	123.73 ± 19.02 ^a

注:所有理化指标值表示3次试验(平均值±标准偏差)%;同一列字母不同表示差异显著($P < 0.05$)。

2.2 挥发性风味物质分析

从4种小曲中共鉴定出41种可靠挥发性组分,主要为醇类12种、酚类7种、烃类6种、醛酮类6种、酸类3种、酯类3种和其它类4种(表2)。其中,从A、B、C和DZ分别检测出24、29、21种和7种。醇类和酚类是构成A、B、C和DZ中风味特征的重要物质,其在A、B和C中的组成和含量明显高于DZ。此外,烃类和其它类仅存在于A、B和C中,并随石斛茎添加量的增加而增加,这可能来自石斛原料^[5]。由此可见,在小曲制备中添加石后,提高了VFCs组成及含量。当添加量为40%时,小曲VFCs种类及含量均为最大值。

味特征的重要物质,其在A、B和C中的组成和含量明显高于DZ。此外,烃类和其它类仅存在于A、B和C中,并随石斛茎添加量的增加而增加,这可能来自石斛原料^[5]。由此可见,在小曲制备中添加石后,提高了VFCs组成及含量。当添加量为40%时,小曲VFCs种类及含量均为最大值。

表2 小曲挥发性风味物质分析

Table 2 Analysis of volatile flavor compounds in Xiaoqu samples

物质名称	RT	含量/ $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$			
		A	B	C	DZ
醇类					
正辛醇	15.35	-	6.06 ± 3.03 ^a	8.25 ± 7.00 ^a	-
正己醇	16.5	2.71 ± 0.43 ^a	0.95 ± 0.49 ^b	-	-
环己醇	18.01	13.06 ± 4.08 ^a	16.23 ± 0.10 ^a	-	-
3-甲基-2-庚醇	18.7	0.71 ± 0.71 ^b	-	2.88 ± 0.13 ^a	-
十三烷醇	18.86	-	2.31 ± 1.29 ^a	-	-
异辛醇	20.89	0.45 ± 0.45 ^a	-	-	-
2,3-丁二醇	22.33	8.05 ± 0.66 ^a	-	-	2.34 ± 2.34 ^b
芳樟醇	22.53	2.04 ± 1.06 ^b	10.84 ± 3.16 ^b	30.31 ± 4.62 ^a	-
1-十一醇	25.19	4.62 ± 4.01 ^b	15.42 ± 1.41 ^b	1.24 ± 0.29 ^b	-
正癸醇	27.35	-	0.53 ± 0.53 ^a	2.24 ± 2.24 ^a	-
苯甲醇	29.59	2.7 ± 0.22 ^b	4.08 ± 0.18 ^a	-	-
苯乙醇	30.19	6.09 ± 0.52 ^a	6.46 ± 0.44 ^a	0.83 ± 0.41 ^b	4.76 ± 0.42 ^a
小计		40.43	62.88	45.74	7.10
酚类					
愈创木酚	29.32	9.11 ± 0.92 ^a	3.09 ± 0.18 ^b	0.35 ± 0.35 ^c	-
4-甲氧基苯酚	29.31	-	-	0.39 ± 0.39 ^a	-
苯酚	31.88	8.99 ± 0.83 ^a	2.76 ± 0.07 ^b	-	-
异丁香酚	34.45	0.36 ± 0.19 ^{ab}	1.13 ± 0.12 ^a	0.82 ± 0.41 ^{ab}	-
2,3,5,6-四甲基苯酚	34.94	-	0.31 ± 0.31 ^a	-	-
4-叔丁基苯酚	34.95	18.05 ± 0.93 ^a	0.89 ± 0.46 ^b	-	-
2,4-二叔丁基苯酚	36.59	8.79 ± 1.50 ^a	14.25 ± 0.61 ^a	19.31 ± 2.43 ^a	14.22 ± 3.67 ^a
小计		45.30	22.43	20.87	14.22

(续表 2)

物质名称	RT	含量/ $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$			
		A	B	C	DZ
烃类					
三氯甲烷	5.28	1.79±0.92 ^a	—	—	—
正十一烷	7.29	—	1.44 ± 0.72 ^a	—	—
临二甲基环己烷	14.62	—	—	3.10 ± 3.10 ^a	—
1-辛烯	15.34	—	—	6.63 ± 6.63 ^a	—
1-十二烯	15.36	—	5.86 ± 2.95 ^a	2.00 ± 2.00 ^a	—
1-十三烯	25.38	—	2.28 ± 0.28 ^a	—	—
小计		1.79	9.58	11.63	—
醛酮类					
正己醛	7.02	6.13 ± 0.31 ^a	0.45 ± 0.45 ^b	0.78 ± 0.40 ^b	0.33 ± 0.33 ^b
壬醛	17.70	1.99 ± 0.26 ^b	4.22 ± 0.45 ^a	1.76 ± 0.41 ^b	—
十一醛	26.39	—	0.43 ± 0.43 ^a	—	—
视黄醛	27.50	0.11 ± 0.11 ^a	—	—	—
4-氯苯丁酮	24.98	—	0.20 ± 0.20 ^a	—	—
苯甲醛	21.78	3.30 ± 1.76 ^b	1.32 ± 1.32 ^b	10.26 ± 1.81 ^a	—
小计		11.53	6.62	12.8	0.33
酸类					
乙酸	19.87	4.59 ± 1.11 ^{ab}	7.07 ± 0.82 ^a	5.39 ± 0.13 ^{ab}	2.13 ± 1.27 ^b
异戊酸	25.44	0.78±0.78 ^a	—	—	—
棕榈酸	44.29	—	0.96 ± 0.96 ^a	—	1.76 ± 1.76 ^a
小计		5.37	8.03	5.39	3.89
酯类					
邻苯二甲酸二甲酯	36.46	—	3.22 ± 0.19 ^a	—	—
邻苯二甲酸二乙酯	37.46	—	0.56 ± 0.29 ^a	—	—
油酸甲酯	38.88	0.31 ± 0.31 ^a	0.33 ± 0.33 ^a	0.18 ± 0.18 ^a	0.95 ± 0.55 ^a
小计		0.31	4.11	0.18	0.95
其它类					
苯并噻唑	30.96	1.67 ± 0.11 ^b	4.44 ± 0.23 ^a	1.71 ± 0.86 ^b	—
1,3-二氢异苯并呋喃	37.83	1.57 ± 0.78 ^a	—	—	—
松油烯	25.96	—	4.89 ± 1.00 ^b	9.73 ± 1.51 ^a	—
3-呋喃甲醇	25.35	—	—	0.32 ± 0.32 ^a	—
小计		3.24	9.33	11.76	—
总计		107.95	122.97	108.50	26.49

注:质量浓度值表示 3 次试验(平均值±标准偏差)%;“—”表示未检出;同列不同字母表示差异显著($P < 0.05$)。

为更好地说明样品小曲间 VFCs 含量的差异,利用正交偏最小二乘判别法(Orthogonal Partial Least Squares Discriminant Analysis, OPLS-DA)进行分析。如图 1a 所示, R^2X 为 0.675, Q^2Y 为 0.93, 说明该模型在分析样品时不存在异常值^[16]。4 种小曲分别位于不同象限, 表明各样品间 VFCs 存在差异。此外, 基于 $VIP > 1.0$ 和 $P < 0.05$, 共筛选出 16 种显著差异代谢物(Important Significantly Different Metabolites, ISDMs), 对其热图统计分析。如图 1b 所示, A、B 和 C 的风味特征仍明显优于

DZ。A、B 和 C 中的 ISDMs 以醇类、醛酮类和酚类为主, 如芳樟醇、正己醇、苯甲醇、苯乙醇、苯甲醛、壬醛、愈创木酚等, 而 DZ 中主要为苯乙醇。这是因为铁皮石斛茎中多糖、苯丙氨酸等可在微生物作用下产生醇类和醛酮类物质^[17]。芳樟醇呈现铃兰香气和木香, 有镇痛、抗炎症的功效^[18]; 苯乙醇呈现玫瑰花香和桃子果香味, 是大曲 VFCs 中优势醇类^[19]; 苯甲醛具有杏仁和焦糖气味^[20]; 壬醛稀释时散发玫瑰和橘子的香气^[21]; 正己醇有青草香气和树叶气味, 能影响白酒香气^[22]; 松油烯呈现柑橘

香和木香,可用于调配柠檬和薄荷香精^[23];愈创木酚有木香及香茱兰的隐香,被证实为白酒中重要挥发性组分^[24]。同时,4个小曲聚类为两大支,A

和B聚为一类,C和DZ聚为另一类。这与O-PLS-DA得分图在t1上的结果一致。

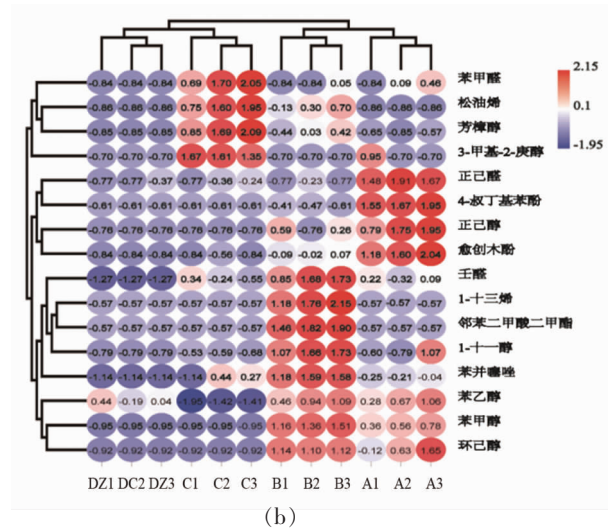
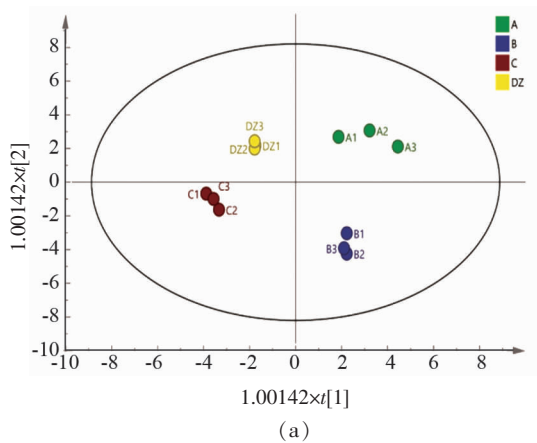


图1 小曲样品挥发性物质的OPLS-DA得分图(a)和重要显著差异物质的聚类热图(b)分析

Fig.1 Opls-da score chart of VFCs (a) and hierarchical clustering heat map of ISDMs (b) in Xiaoqu samples

2.3 样品中细菌的分析

2.3.1 细菌α-多样性分析 A、B、C和DZ在97%相似度水平下进行聚类,共获得OTUs平均数分别为214,393,582和339(表3)。由表3可知,覆盖率在98.44%~99.81%间,表明未被检出序列的概率较小^[25]。本研究测序结果能真实反映小曲

样品中细菌微生物真实情况。此外,Chao1指数和Shannon指数被用来描述物种丰度和多样性。C的Chao1和Shannon指数最大(619.12和7.87),而A的Chao1和Shannon指数最小(341.88和0.40)。添加50%石斛茎时,小曲细菌群落组成和结构最复杂。

表3 小曲细菌微生物α-多样性分析

Table 3 α-Diversity index of bacterial microorganism in Xiaoqu

样品编号	OTU数	ACE指数	Chao 1指数	Shannon指数	覆盖率%
A	214	384.77	341.88	0.40	99.81
B	393	427.83	437.72	3.52	99.73
C	582	603.23	619.12	7.87	99.71
DZ	339	384.27	401.01	5.86	98.44

2.3.2 细菌群落结构分析 在门水平上,从4个小曲中共检测到22个细菌门,图2a显示丰度前10的物种,其余物种合并为其它。A和B以厚壁菌门(Firmicutes)为绝对优势细菌门,分别占比96.96%和75.40%。此外,B中变形菌门(Proteobacteria,13.59%)同样占优势。C以厚壁菌门(32.36%)、变形菌门(26.13%)和拟杆菌门(Bacteroidetes,23.98%)为优势细菌门。同时,B和C中

还含有少量酸杆菌门(Acidobacteria)和放线菌门(Actinobacteria)。DZ以厚壁菌门(12.91%)、变形菌门(29.99%)、酸杆菌门(16.47%)和蓝细菌门(Cyanobacteria,12.63%)为优势细菌门。据报道,厚壁菌门、变形菌门、酸杆菌门和拟杆菌门是小曲中主要优势细菌门^[26-28]。A、B和C中厚壁菌门与拟杆菌门含量比DZ中高,可能是石斛多糖促进其生长,这与张俊楠等^[29]研究结果相似。

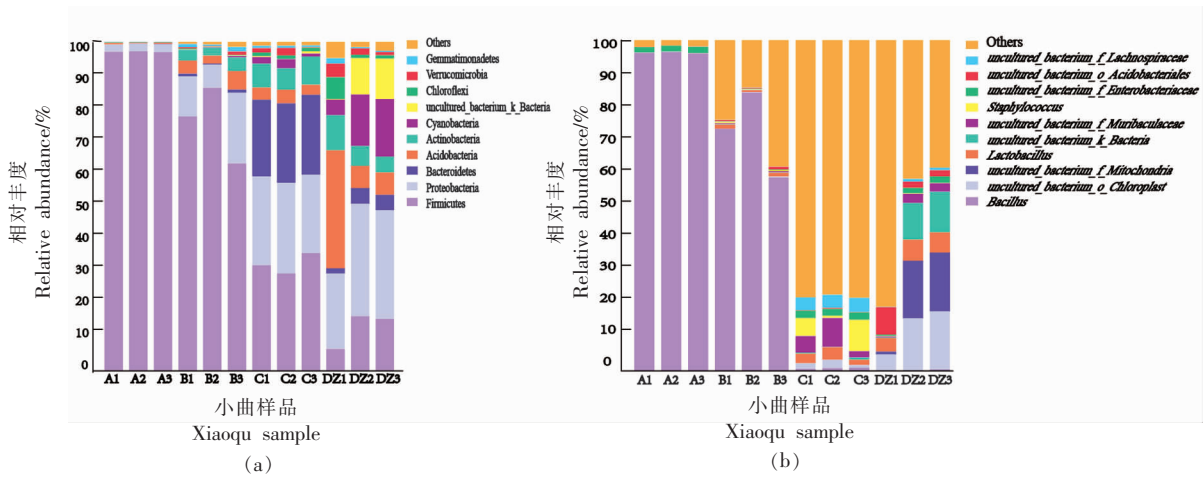


图 2 小曲在细菌门水平(a)和属水平(b)的群落组成

Fig.2 Community composition of Xiaoqu at phylum level (a) and genus level (b)

在属水平上,共检测到 342 个细菌属。图 2b 显示丰度前 10 的物种,其余物种归类为其它。如图 2b 所示,A、B 和 C 与 DZ 细菌群落存在较大差异,且无规律可言。芽孢杆菌属(*Bacillus*)是 A (96.13%)和 B(71.89%)中的优势细菌属。C 以 2.75%的乳酸杆菌属(*Lactobacillus*)、5.26%的 *uncultured_bacterium_f_Muribaculaceae*、5.15% 的葡萄球菌属 (*Staphylococcus*) 和 4.05%的 *uncultured_bacterium_f_Lachnospiraceae* 为优势细菌属。DZ 以 *uncultured_bacterium_o_Chloroplast*、*uncultured_bacterium_f_Mitochondria*、乳酸杆菌和 *uncultured_bacterium_k_Bacteria* 为优势细菌属,分别占比 12.63%,12.04%,5.51%和 7.83%。

uncultured_bacterium_f_Muribaculaceae 属于拟杆菌门细菌,于 2002 年首次被发现,可产生维生素 B12,能治疗恶性贫血症^[31]。*uncultured_bacterium_f_Muribaculaceae*、*uncultured_bacterium_f_Enterobacteriaceae* 和 *uncultured_bacterium_f_Lachnospiraceae* 分别属于拟杆菌门、变形菌门和厚壁

菌门,其为水稻秸秆和糖浆废水共发酵过程中的产酸优势菌门^[32]。芽孢杆菌属在 A 和 B 中占优势,是因为石斛能促进其繁殖^[33]。芽孢杆菌属通过分泌蛋白酶和淀粉酶赋予小曲糖化力、液化力和发酵力^[34],并与吡嗪类、酯类、醇类和有机酸类物质密切相关^[35]。乳酸杆菌属能产生丰富有机酸,还能产生细菌素抑制致病菌^[36]。由此可见,当添加 30% 石斛时,小曲有益细菌比例最高,添加量为 50% 时不利于有益细菌繁殖。

2.4 样品中真菌的分析

2.4.1 真菌 α -多样性分析 由表 4 可知,基于 97%相似度,分别获得 OTUs 数为 80(A)、444(B)、510(C)、121(DZ)。覆盖率均大于 99.0%,表明测序结果基本反映样品小曲中真菌群落结构的多样性。C 的 Chao1 和 Shannon 指数最大(577.80 和 5.83),而 DZ 的 Chao1 和 Shannon 指数最小(140.88 和 1.24)。这表明 C 的真菌群落丰富度和多样性最高,DZ 最低,即添加 50% 石斛茎时,小曲真菌群落组成及结构最复杂。

表 4 小曲真菌微生物 α -多样性分析

Table 4 α -Diversity index of fungus microorganism in Xiaoqu

样品编号	OTU 数	ACE 指数	Chao 1 指数	Shannon 指数	覆盖率%
A	380	471.72	491.49	2.36	99.82
B	444	506.97	514.30	3.42	99.89
C	510	561.32	577.80	5.83	99.91
DZ	121	145.88	140.47	1.24	99.96

2.4.2 真菌群落结构分析 在门水平上,共检出7个真菌物种。如图3a所示,A、B、C、DZ优势真菌门均为子囊菌门(Acomycota)和毛霉菌门(Mucoromycota),分别占比54.53%、46.56%、50.27%、82.42%和42.92%、47.25%、33.38%、17.45%。据报道,子囊菌门和毛霉菌门在不同酒曲中占主

导^[37-38]。值得注意的是担子菌门(Basidiomycota)仅存在于A、B和C中,且与石斛茎添加量呈正比关系。毛霉菌门和担子菌门在A、B和C中明显增加,说明石斛茎中某些活性成分能促进毛霉菌门与担子菌门生长。

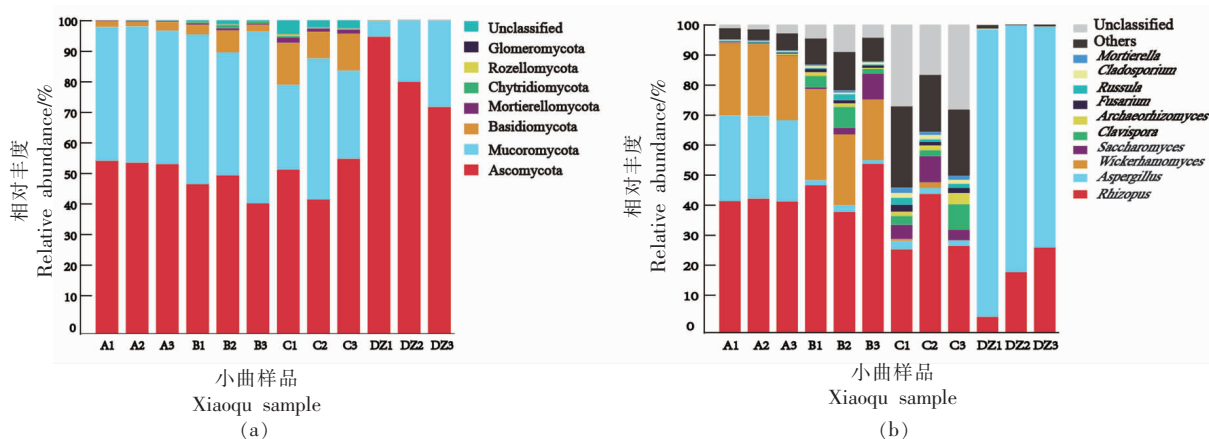


图3 小曲在门水平(a)和属水平(b)真菌群落组成

Fig.3 The fungus composition of Xiaoqu at phylum level (a) and genus level (b)

在属水平上,共检测到226个真菌属。图3b显示相对丰度前10的物种,其余物种分别归类为其它和未分类。DZ与A、B和C间真菌群落存在差异,同时,A、B和C间也存在差异。A中优势真菌属为根霉菌属(*Rhizopus*,42.89%)、曲霉菌属(*Aspergillus*,26.97%)和威克汉姆酵母属(*Wickerhamomyces*,22.59%)。B中优势真菌属为根霉菌属(47.25%)和威克汉姆酵母属(24.06%);C中优势真菌属为根霉菌属(33.37%)。同时,A、B和C中还有少量酿酒酵母属(*Saccharomyces*)、棒孢酵母属(*Clavispora*)、古根菌属(*Archaeorhizomyces*)和镰刀菌属(*Fusarium*)。DZ中真菌物种组成较为简单,优势真菌属为根霉菌属(17.42%)和曲霉菌属(81.60%)。

研究表明,石斛能促进根霉菌属和酿酒酵母属繁殖,相反抑制曲霉菌属生长^[38-39],这解释了为何石斛小曲中根霉菌属和酿酒酵母属增多,而曲霉菌属明显减少的变化趋势。根霉菌属和曲霉菌属作为小曲中核心真菌属,能产生多种水解酶,用于淀粉糖化和蛋白质水解生成还原糖及氨基酸^[40-41],且曲霉属与吡嗪类、酯类和芳香族化合物的形成有密切联系^[33]。威克汉姆酵母属是常见的

非酿酒酵母,能促进酚类及芳香类物质形成^[42]。酿酒酵母属是乙醇的主要生产者,同时也能产生酯类和高级醇^[43]。古根菌属、镰刀菌属、芽枝霉属和被孢霉属主要存在于A、B和C中,且与石斛茎添加量存在正比关系,因此推测其来自石斛原料。镰刀菌属与芽孢杆菌属存在拮抗作用^[44],因此C中芽孢菌属含量较少。综上,当添加30%石斛茎时,小曲中有益真菌种类及含量最大,利于发酵;相反,添加50%石斛茎时不利于有益真菌生长,这与细菌群落结构分析一致。

2.5 小曲群落相似性聚类分析

为更好地说明样品小曲中微生物群落的差异,分别对细菌和真菌组成进行主成分分析(Principal Component Analysis,PCA)及层级聚类分析(Hierarchical Cluster Analysis,HCA)。如图4a所示,PC1和PC2对细菌群落差异的贡献率之和高达94.2%,能较好地反映样品小曲间细菌群落差异。A和B与C和DZ分别位于主坐标轴左、右两侧,说明A和B与C和DZ之间差异较大。图4b显示,4个小曲聚两大支,A和B聚为一类,C和DZ聚为另一类,这与PCA结果一致。如图4c所示,PC1和PC2对真菌群落差异贡献率之和高达

97.4%。A、B 和 C 与 DZ 分别位于主坐标轴左、右两侧,表明 A、B 和 C 与 DZ 间差异较大。图 4d 显

示,A、B 和 C 聚为一类,DZ 聚为另一类,这与 PCA 结果一致。

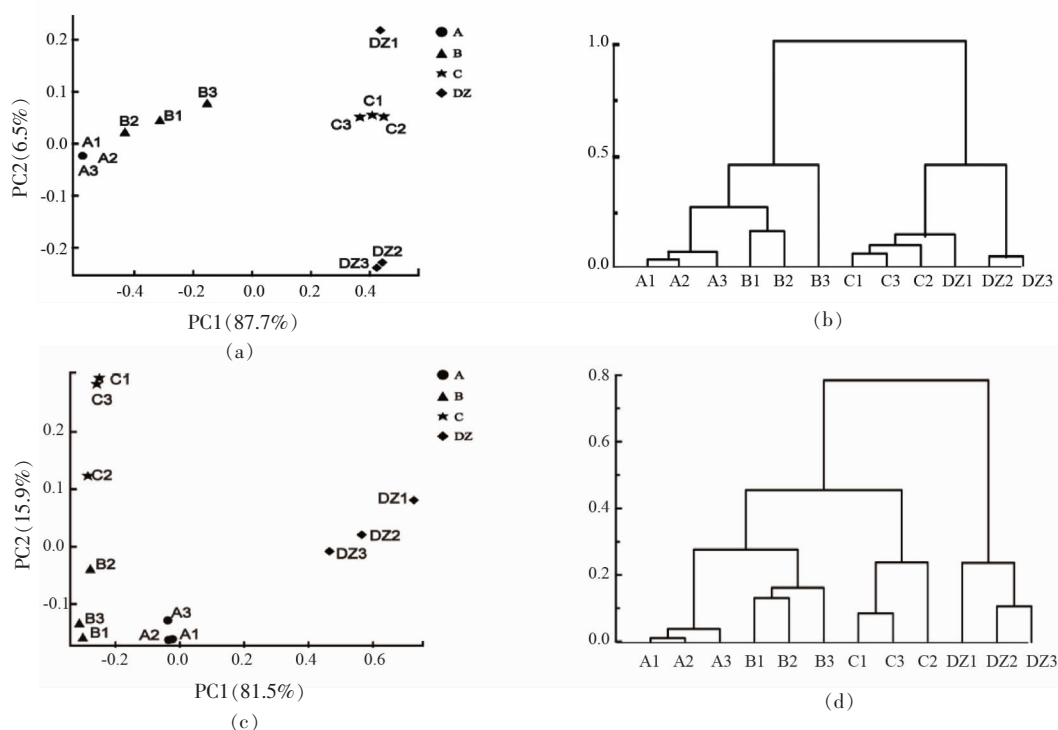


图 4 小曲细菌群落主成分(a)和层级聚类(b),真菌群落主成分(c)和层级聚类(d)分析图

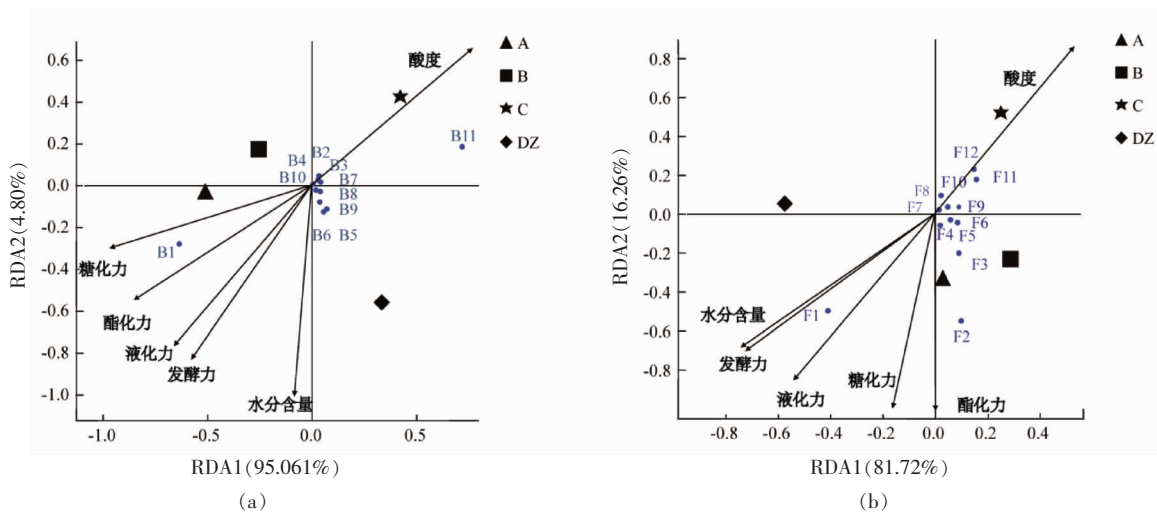
Fig.4 PCA (a) and HCA (b) of bacterial community, PCA (c) and HCA (d) of fungal community in Xiaoqu samples

2.6 关联性分析

2.6.1 小曲微生物与理化性质的冗余分析 冗余分析(Redundancy Analysis, RDA)分析了小曲微生物与理化性质间的相关性。如图 5a 所示,芽孢杆菌属与发酵力、糖化力、液化力及酯化力呈正相关,A 和 B 细菌群落结构相似,因此与这 4 个理化指标相关性高。葡萄球菌属和乳酸杆菌属与酸度呈正相关,酸度主要与小曲 C 有较高相关性;葡萄球菌属在白酒生产中起何作用至今未见报道,但葡萄球菌属中的腐生葡萄球菌属可通过产生酸性蛋白酶降低环境酸度^[45-46]。如图 5b 所示,根霉菌属、威克汉姆酵母和曲霉菌与液化力、发酵力、糖化力和酯化力呈正相关,其中 A 和 B 与液化酶活力、糖化酶活力、发酵力和酯化力相关性较高。镰刀菌属、红菇属、古根菌属、芽枝霉属、被孢霉属和棒孢酵母属则与酸度呈较强正相关,C 与酸度相关性最高。综上所述,真菌对小曲理化特性形成的

影响较大。

2.6.2 小曲微生物与挥发性组分相关性分析 基于 Spearman 算法分别剖析细菌和真菌在属水平前 10 的物种与 16 种 ISDMs 间的相关性,借助 R 语言软件进行热图可视化分析。如图 6a 所示,芽孢杆菌属与环己醇、苯甲醇、正己醇、4-叔丁基苯酚和正己醛呈显著正相关,这与 Azokpota 等^[47]研究一致。葡萄球菌属与松油烯和芳樟醇呈显著正相关。如图 6b 所示,根霉菌属和威克汉姆酵母属与醛酮类、醇类和酚类物质呈正相关,如环己醇、苯甲醇、正己醇、1-十一醇和愈创木酚等,这与 Chen 等^[48]和刘晓柱等^[49]的研究结果一致。酿酒酵母属与 1-十一醇、壬醛、芳樟醇、松油烯、苯甲醛和苯并噻唑呈正相关;酿酒酵母属在白酒酿造过程中的主要作用是产生醇类物质,同时也与醛类物质的形成有关^[50]。苯并噻唑、1-十一醇、壬醛、芳樟醇、松油烯、3-甲基-2-庚醇和苯甲醛与红菇



注: B1: 芽孢杆菌属 (*Bacillus*); B2: 葡萄球菌属 (*Staphylococcus*); B3: *uncultured_bacterium_f_Mitochondria*; B4: *uncultured_bacterium_o_Chloroplast*; B5: *uncultured_bacterium_f_Enterobacteriaceae*; B6: *uncultured_bacterium_f_Muribaculaceae*; B7: 乳酸杆菌属 (*Lactobacillus*); B8: *uncultured_bacterium_k_Bacteria*; B9: *uncultured_bacterium_o_Acidobacteriales*; B10: *uncultured_bacterium_f_Lachnospiraceae*; B11: 其它 (Others); F1: 曲霉属 (*Aspergillus*); F2: 根霉属 (*Rhizopus*); F3: 威克汉姆酵母属 (*Wickerhamomyces*); F4: 古根菌属 (*Archaeorhizomyces*); F5: 镰刀菌属 (*Fusarium*); F6: 红菇属 (*Russula*); F7: 芽枝霉属 (*Cladosporium*); F8: 被孢霉属 (*Mortierella*); F9: 棒孢酵母属 (*Clavispora*); F10: 酿酒酵母属 (*Saccharomyces*); F11: 其它 (Others); F12: 未分类 (Unclassified)。

图5 细菌(a)和真菌(b)群落与环境因子的冗余分析

Fig.5 Redundancy analysis of bacterial (a) and fungal (b) community and environmental factors

菌属、棒孢酵母菌、古根菌属、镰刀菌属、芽枝霉属和被孢霉属呈正相关。根据重要显著差异挥发性风味热图(图2b)和真菌群落组成图(图5b)可知, 芳樟醇、松油烯等7种风味组分和古根菌属、镰刀

菌属等6个真菌属在A、B和C中含量较高, 推测其与石斛原料存在密切关联, 而彼此间具体联系还需进一步研究。

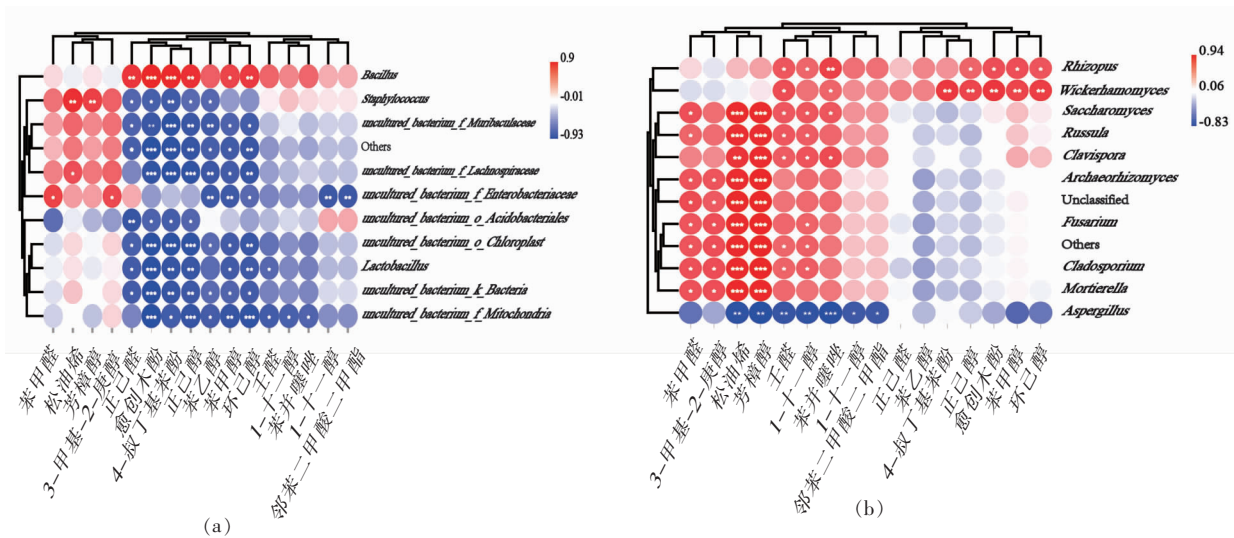


图6 细菌(a)和真菌(b)群落与重要显著差异风味物质相关性分析

Fig.6 Correlation analysis between bacterial (a) and fungal (b) communities and important significantly different metabolites

3 结论

采用高通量测序技术结合 HS-SPME/GC-MS 分析石斛添加量对小曲微生物群落、理化特性和挥发性风味物质的影响。结果发现: DZ 优势细菌属为 *uncultured_bacterium_o_Chloroplast*、*uncultured_bacterium_f_Mitochondria* 和乳酸杆菌属, 优势真菌属为根霉菌属和曲霉菌属。A、B 和 C 中优势细菌属为芽孢杆菌, 优势真菌属存在差异, 主要为根霉菌属、曲霉菌属和威克汉姆酵母属。添加石斛茎增大了小曲中芽孢杆菌和根霉菌等有益微生物含量。当添加量为 30% 时, 小曲有益细菌和真菌物种占比最大。与 DZ 相比, 石斛茎明显增加了烃类、醇类、酚类和醛酮类化合物的种类和含量。小曲样品不同理化特性间存在差异, 添加 30% 石斛茎时提高了小曲糖化力、液化力、发酵力和酯化力等。相关性分析显示, 芽孢杆菌属、根霉菌属和威克汉姆酵母属与糖化力、液化力、发酵力和酯化力, 醇类、酚类和醛酮类物质呈正相关。综上, 最终确定添加 30% 石斛茎时小曲品质最好。同时要注意制曲过程的卫生状况, 降低不可培养的细菌含量。

参 考 文 献

- [1] 荣瑞金, 李祖明, 王德良, 等. 中国酒曲微生物研究进展[J]. 中国酿造, 2009(6): 5-8.
RONG R J, LI Z M, WANG D L, et al. Research progress on microorganisms in Chinese liquor Qu[J]. China Brewing, 2009(6): 5-8.
- [2] KIM S, JO K, BYUN B S, et al. Chemical and biological properties of puffed *Dendrobium officinale* extracts; Evaluation of antioxidant and anti-fatigue activities[J]. Journal of Functional Foods, 2020, 73: 104144.
- [3] 周恒刚. 制曲入药[J]. 酿酒科技, 1999, (4): 5-6, 10.
ZHOU H G. Making koji with the addition of Chinese herbs[J]. Liquor-Making Science & Technology, 1999, (4): 5-6, 10.
- [4] 吴志, 陈晓芸. 甜酒曲主要微生物的分离、筛选及其中草药制曲工艺研究[J]. 轻工科技, 2020, 36(5): 18-20.
WU Z, CHEN X Y. Isolation and screening of main microorganisms from sweet wine starter and study on the technology of Chinese herbal stater preparation. Light Industry Science and Technology, 2020, 36(5): 18-20.
- [5] 禹晓婷. 黑糯米酒工艺优化及发酵过程代谢组学研究[D]. 贵阳: 贵州大学, 2019.
YU X T. Optimization of technological conditions and metabolomics research in the fermentation process of black glutinous rice wine [D]. Guiyang: Guizhou University, 2020.
- [6] HUANG Y H, YI Z L, JIN Y L, et al. New microbial resource: Microbial diversity, function and dynamics in Chinese liquor starter[J]. Scientific Reports, 2017, 7(1): 14577.
- [7] ZHAO C, SU W, MU Y C, et al. Integrative metagenomics-metabolomics for analyzing the relationship between microorganisms and non-volatile profiles of traditional Xiaoqu[J]. Frontiers in Microbiology, 2021, 11: 617030.
- [8] TANG Q X, HE G Q, HUANG J, et al. Characterizing relationship of microbial diversity and metabolite in Sichuan Xiaoqu[J]. Frontiers in Microbiology, 2019, 10: 696.
- [9] 王福荣. 酿酒分析与检测[M]. 北京: 化学工业出版社, 2012: 11-18.
WANG F R. Winemaking analysis and detection[M]. Beijing: Chemical Industry Press, 2012: 11-18.
- [10] 沈怡方. 白酒生产技术全书[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 1998: 899-901.
SHEN Y F. Baijiu production technology[M]. Beijing: China Light Industry Press, 1998: 899-901.
- [11] ZHENG X W, YAN Z, HAN B Z, et al. Complex microbiota of a Chinese "Fen" liquor fermentation starter (Fen-Daqu), revealed by culture-dependent and culture-independent methods[J]. Food Microbiology, 2012, 31(2): 293-300.
- [12] FAN G, SUN B, FU Z, et al. Analysis of physico-chemical indices, volatile flavor components, and microbial community of a light-flavor Daqu[J]. Journal of the American Society of Brewing Chemists, 2018, 76(3): 209-218.
- [13] XIONG X, YAN N, HUANG Y, et al. Analysis of the difference in physicochemical indexes and microbial quantity of baiyunbian high-temperature Daqu produced by different techniques[J]. Liquor-Making Science & Technology, 2014, (1): 21-23.

- [14] YAN Z K, MENG Q Y, WANG X Z, et al. Analysis on physicochemical indexes and cultivation technology of traditional Xifeng Daqu sensory evaluation[J]. *Liquor Making*, 2016, 43(5): 51-55.
- [15] 邹晖, 王伟英, 戴艺民, 等. GC-MS法比较分析铁皮石斛原球茎和花的挥发性成分[J]. *福建农业科技*, 2019, (9): 50-56.
- ZOU H, WANG W Y, DAI Y M, et al. Comparative analysis of volatile components of *Dendrobium officinale* protocorm and flower by GC-MS[J]. *Fujian Agricultural Science and Technology*, 2019, (9): 50-56.
- [16] 张颖颖, 王守伟, 康超娣, 等. 基于多元统计分析的牛排掺假定量判别及差异分析[J]. *食品科学*, 2021, 42(24): 276-282.
- ZHANG Y Y, WANG S W, KANG C D, et al. Quantitative discrimination and differential analysis of steak adulteration based on multivariate statistical analysis[J]. *Food Science*, 2021, 42(24): 276-282.
- [17] 欧斯健. 铁皮石斛多糖、氨基酸特征指纹图谱应用及多糖含量测定方法优化研究[D]. 广州: 广州中医药大学, 2014.
- OU S J. The application of characteristic fingerprint technology of the *Dendrobium officinale* polysaccharide and amino acid, and study on the optimization of determination content method of *Dendrobium officinale* polysaccharide [D]. Guangzhou: Guangzhou University of Chinese Medicine, 2014.
- [18] 姜冬梅, 朱源, 余江南, 等. 芳樟醇药理作用及制剂研究进展[J]. *中国中药杂志*, 2015, 40(18): 3530-3533.
- JIANG D M, ZHU Y, YU J N, et al. Advances in research of pharmacological effects and formulation studies of linalool[J]. *China Journal of Chinese Materia Medica*, 2015, 40(18): 3530-3533.
- [19] 古翀羽, 冉茂芳, 魏阳, 等. 不同配料青稞大曲理化特性与微生物群落相关性研究[J]. *食品与发酵工业*, 2021, 47(22): 126-135.
- GU C Y, RAN M F, WEI Y, et al. Correlation of physicochemical properties and microbial community in highland barley Daqu fermented with various materials[J]. *Food and Fermentation Industries*, 2021, 47(22): 126-135.
- [20] YU H Y, XIE T, XIE J R, et al. Characterization of key aroma compounds in Chinese rice wine using gas chromatography-mass spectrometry and gas chromatography-olfactometry[J]. *Food Chemistry*, 2019, 293: 8-14.
- [21] 王晓欣. 酱香型和浓香型白酒中香气物质及其差异研究[D]. 无锡: 江南大学, 2014.
- WANG X X. Comparison on aroma compounds of soy sauce and strong aroma type liquors[D]. Wuxi: Jiangnan University, 2014.
- [22] 管敬喜, 杨莹, 文仁德, 等. 广西酿酒葡萄果实挥发性香气成分分析[J]. *酿酒科技*, 2018(1): 97-103.
- GUAN J X, YANG Y, WEN R D, et al. Aromatic components of wine grapes in Guangxi[J]. *Liquor-Making Science & Technology*, 2018 (1): 97-103.
- [23] 李晓颖, 曹翠玲, 武军凯, 等. 顶空气相色谱-质谱联用法分析两种玉兰花挥发性成分[J]. *食品科学技术学报*, 2017, 35(5): 53-60.
- LI X Y, CAO C L, WU J K, et al. Analysis on volatile components of two kinds of *Magnolia flowers* by headspace gas chromatography-mass spectrometry[J]. *Journal of Food Science and Technology*, 2017, 35(5): 53-60.
- [24] 耿平兰, 黄卫红, 程化鹏. 白酒中酚类物质及检测方法的研究进展[J]. *酿酒科技*, 2020(8): 83-88.
- GENG P L, HUANG W H, CHENG H P. Research progress of phenols in baijiu and their detection methods[J]. *Liquor-Making Science & Technology*, 2020(8): 83-88.
- [25] 黎瑶依, 胡小霞, 黄永光. 茅台镇酱香型白酒酿造环境中真菌菌群多样性分析[J]. *食品科学*, 2021, 42(18): 164-170.
- LI Y Y, HU X X, HUANG Y G. Analysis of the diversity of fungal flora in maotai-flavor liquor brewing environment in Maotai town[J]. *Food Science*, 2021, 42(18): 164-170.
- [26] WU H, ZHANG S, MA Y, et al. Comparison of microbial communities in the fermentation starter used to brew Xiaoqu liquor[J]. *Journal of the Institute of Brewing*, 2017, 123(1): 113-120.
- [27] 宁亚丽, 吴跃, 何婧, 等. 基于高通量测序技术分析朝鲜族传统米酒及其酒曲中微生物群落多样性[J]. *食品科学*, 2019, 40(16): 107-114.
- NING Y L, WU Y, HE Q, et al. Analysis of microbial community diversity in Chinese korean traditional rice wine and its starter culture using high-throughput sequencing[J]. *Food Science*, 2019, 40 (16): 107-114.
- [28] BORA S S, KEOT J, DAS S, et al. Metagenomics

- analysis of microbial communities associated with a traditional rice wine starter culture (Xaj-pitha) of Assam, India[J]. *Biotech*, 2016, 6(2): 153.
- [29] 张俊楠. 体外发酵法研究铁皮石斛多糖对人肠道菌群的影响[D]. 厦门: 厦门大学, 2018.
ZHANG J N. Effect of polycaccharide from *Dendrobium officinale* on human intestinal flora *in vitro* fermentation[D]. Fujian: Xiamen University, 2018.
- [30] BOS N A, PATERSON Y, JONG H D, et al. Analysis of 16S libraries of mouse gastrointestinal microflora reveals a large new group of mouse intestinal bacteria[J]. *Microbiology*, 2002, 148(11): 3651-3660.
- [31] 李连华, 孙永明, 袁振宏, 等. 木质纤维素类原料厌氧发酵性能及微生物群落组成研[C]//中国沼气学会学术年会暨中德沼气合作论坛论文集. 广州: 中国沼气协会, 2015.
LI L H, SUN Y M, YUAN Z H, et al. Anaerobic digestion performance and prokaryotic community structure of lignocellulose materials[C]//Collected Papers of the Academic Annual Meeting of China Biogas Society and Sino German Biogas Cooperation Forum. Guangzhou: China Biogas Association, 2015.
- [32] 彭买姣, 肖新云, 谭周进, 等. 铁皮石斛对微生物生长影响的研究[J]. *中国微生态学杂志*, 2015, 27(6): 654-657.
PENG M J, XIAO X Y, TAN Z J, et al. The effect of *Dendrobium officinale* on the growth of microbiota[J]. *Chinese Journal of Microecology*, 2015, 27(6): 654-657.
- [33] JIN Y, LI D, 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.
- [34] HE G Q, HUANG J, WU C D, et al. Bioturbation effect of fortified Daqu on microbial community and flavor metabolite in Chinese strong-flavor liquor brewing microecosystem[J]. *Food Research International*, 2019, 129: 108851.
- [35] 张双燕, 廖永红, 纪南, 等. 基于高通量测序技术分析北京清香型大曲微生物多样性[J]. *中国酿造*, 2016, 35(11): 49-53.
ZHANG S Y, LIAO Y H, JI N, et al. Analysis on microbial diversity of Beijing light-flavor Daqu by high-throughput sequencing [J]. *China Brewing*, 2016, 35(11): 49-53.
- [36] 王丹丹, 沈馨, 董蕴, 等. 孝感凤窝酒曲真菌多样性评价[J]. *中国酿造*, 2017, 36(11): 38-42.
WANG D D, SHEN X, DONG Y, et al. Evaluation of fungal diversity in Xiaogan Fengwo rice wine koji[J]. *China Brewing*, 2017, 36(11): 38-42.
- [37] 胡晓龙, 王康丽, 牛广杰, 等. 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.
HU X L, WANG K L, NIU G J, et al. 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.
- [38] 谭恺. 铁皮石斛饮片对微生物生长的影响[J]. *现代农业科技*, 2018, (1): 235-236.
TAN K. Effect of *Dendrobium candidum* pieces on microbial growth[J]. *Modern Agricultural Science and Technology*, 2018, (1): 235-236.
- [39] 王丹, 袁永俊, 谭青云, 等. 不同菌种发酵对铁皮石斛多糖及其生物活性的影响[J]. *中国调味品*, 2019, 44(9): 39-43.
WANG D, YUAN Y J, TAN Q Y, et al. Effects of different strains fermentation on polysaccharide and biological activity of *Dendrobium candidum*[J]. *China Condiment*, 2019, 44(9): 39-43.
- [40] HUANG Z R, HONG J L, XU J X, et al. Exploring core functional microbiota responsible for the production of volatile flavour during the traditional brewing of Wuyi Hong Qu glutinous rice wine [J]. *Food Microbiology*, 2018, (76): 487-496.
- [41] WU X, JING R, CHEN W, et al. High-throughput sequencing of the microbial diversity of roasted-sesame-like flavored Daqu with different characteristics[J]. *Biotech*, 2020, 10(11): 502-502.
- [42] MEDFIN H, WON J K. Antioxidant properties of fermented green coffee beans with *Wickerhamomyces anomalus* (strain KNU18Y3)[J]. *Fermentation*, 2020, 6(1): 18-18.
- [43] 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.
- [44] XING Y M, CHEN J, CUI J L, et al. Antimicrobial activity and biodiversity of endophytic fungi in

- Dendrobium devonianum* and *Dendrobium thyrsiflorum* from Vietnam[J]. *Current Microbiology*, 2011, 62(4): 1218–1224.
- [45] TIAN N, GUO X, WANG M, et al. Bacterial community diversity of shilixiang baijiu Daqu based on metagenomics[J]. *Journal of Food Biochemistry*, 2020, 44(10): 13410.
- [46] 王晓丹, 胡宝东, 班世栋, 等. 酱香型大曲酶系与大曲中微生物产酶关系的研究[J]. *酿酒科技*, 2015, (9): 1–7.
- WANG X D, HU B D, BAN S D, et al. The relations between enzyme system in Jiangxiang Daqu and enzyme produced by microbial metabolism[J]. *Liquor-Making Science & Technology*, 2015, (9): 1–7.
- [47] AZOKPOTA D P, HOUNHOUGAN J D, ANNAN N T, et al. Volatile compounds profile and sensory evaluation of Beninese condiments produced by inoculation of *Bacillus subtilis*[J]. *Journal of the Science of Food & Agriculture*, 2010, 90(3): 438–444.
- [48] CHEN C, LIU Y, TIAN H X, et al. Metagenomic analysis reveals the impact of JIUYAO microbial diversity on fermentation and the volatile profile of Shaoxing -jiu [J]. *Food Microbiology*, 2020, 86: 103326.
- [49] 刘晓柱, 黎华, 李银凤, 等. 接种异常威克汉姆酵母对空心李果酒理化特性及香气组分的影响[J]. *食品科技*, 2020, 45(11): 21–27.
- LIU X Z, LI H, LI Y F, et al. Effects of Inoculation *Wickerhamomyces anomalus* on the physico-chemical property and aroma profile of *Prunus salicina* Lindl.cv ‘Kongxinli’ Fruit Wine[J]. *Food Science and Technology*, 2020, 45(11): 21–27.
- [50] YAN S B, TONG Q Q, GUANG J Q. Yeast dynamics and changes in volatile compounds during the fermentation of the traditional Chinese strong-flavor Daqu[J]. *LWT*, 2019, 106: 57–63.

Effect of *Dendrobium* Addition on Microorganism and Flavor of Xiaoqu

Chen Xiaojin, Mu Yingchun*, Su Wei, Jiang Li, Zhao Chi

(School of Liquor and Food Engineering, Guizhou University, Guiyang 550025)

Abstract In order to explore the effect of *Dendrobium* stem addition on microbial community structure and volatile flavor substances of Xiaoqu, the microbial community structure composition and volatile flavor compounds in traditional Xiaoqu (DZ) and three kinds of Xiaoqu (A, B and C) with different *Dendrobium* stem addition were analyzed by high-throughput sequencing technology, headspace solid-phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry, respectively. The results showed significant differences in microbial communities and flavor substances compared DZ with AB and C. At the genus level, the dominant bacteria genera of DZ were uncultured_bacterium_o_Chloroplast, uncultured_bacterium_f_Mitochondria and *Lactobacillus*. And the dominant fungi genera were *Rhizopus* and *Aspergillus*. The dominant bacteria genera of A, B and C was *Bacillus*, and the dominant fungi genera were *Rhizopus*, *Aspergillus* and *Wickerhamomyces*. Meanwhile, the relative abundance of *Bacillus*, *Rhizopus* and *Wickerhamomyces* increased with the addition of *Dendrobium* stem as well. However, the addition amount of 50% was not conducive to the growth of beneficial microorganisms. A total of 41 volatile flavor substances were identified in Xiaoqu samples, and 16 important significantly different metabolites were selected (VIP > 1.0, P < 0.05). Among them, A (13 kinds), B (15 kinds), C (10 kinds) and DZ (2 kinds) were selected, respectively. Orthogonal partial least squares discriminant analysis showed that there was a slight differences between A, B and C, DZ. In addition, the correlation analysis showed that there was a certain correlation between the dominant microorganism and physical and chemical properties, and had a positive correlation with alcohols, phenols, aldehydes and ketones, also. It was found that the quality of Xiaoqu was better when 30% *Dendrobium* stem was added, which provided a theoretical basis for the functional application of *Dendrobium* Xiaoqu.

Keywords *Dendrobium*; Xiaoqu; microbial diversity; volatile flavor components; correlation analysis