

顶温对红心曲微生物群落结构及理化性质的影响

王昊乾¹, 刘昌录³, 顾铁刚³, 任晓壮¹, 唐艺婧¹, 张秀红^{2*}

¹山西师范大学生命科学学院 太原 030002

²山西师范大学食品科学学院 太原 030002

³内蒙古阿尔一一九八酒业有限公司 内蒙古乌兰浩特 137400

摘要 制曲温度能显著影响大曲的理化指标及微生物群落结构,因而大曲分为高温曲、中温曲和低温曲。在清香大曲制作中小范围改变温度,对其微生物及理化性质的影响并不清楚。本研究比较不同顶温对红心曲微生物群落结构及其理化性质的影响。结果表明:两组红心曲中微生物多样性没有显著区别,而属水平微生物群落结构发生明显变化。顶温升高 5℃,红心曲真菌中嗜热子囊菌由原来的 64.7%增至 78.4%,扣囊膜酵母则由 33.3%降至 15.2%,显著增加的还有产淀粉酶的曲霉和根霉。顶温升高后显著增加的细菌有醋酸菌、魏斯氏菌和葡萄球菌等,均有利于白酒风味的形成。大曲中一般少量的放线菌类糖多孢菌由 26.7%降至 8.8%。理化性质方面,顶温升高 5℃大曲糖化力由 596.9 U 降至 516.1 U,液化力由 1.26 U 降至 1.05 U,但下降均不显著;发酵力和酒化力有所增加,发酵力由 0.74 U 增至 2.27 U,酒化力由 7.1% vol 提高到 8% vol。结合实际情况提高顶温,能优化大曲微生物群落结构,改善综合质量,研究结果为红心曲的优质高产提供理论基础。

关键词 红心曲; 顶温; 微生物群落; 理化性质

文章编号 1009-7848(2024)03-0075-11 DOI: 10.16429/j.1009-7848.2024.03.008

中国白酒酿造的工艺特点是制曲酿酒。大曲是中国白酒酿造的糖化发酵剂,可将酿酒原料中的淀粉降解为还原糖,进而将还原糖转为化酒精。因此,大曲对于白酒酿造非常重要。大曲本身的生产工艺特点是生料制曲、自然接种和开放培养。这些特点使得来源于原料、工具和环境的微生物大量生长繁殖,产生热量,使得曲坯和曲房的温度升高,制曲过程中最重要的操作是温度控制,根据制曲过程中顶温的区别可将大曲分为高温大曲、中温大曲和低温大曲,分别用于酱香、浓香和清香白酒的酿造^[1]。大曲接种的微生物并非全是酿酒所需的微生物,制曲原料及生产工艺会对酿酒微生物进行筛选,如大曲制作中,原料大麦、小麦和豌豆含有大量的淀粉,容易筛选到产生淀粉酶的各类微生物,并且积累淀粉酶将酿酒原料中的淀粉降解。培养条件中最重要的是温度,温度也是筛选酿酒微生物的重要条件^[2]。

有关温度对大曲微生物群落结构、理化生化指标等性状的影响已有较多的研究文献。姚亚林等^[3]比较了酱香高温和浓香中温大曲制曲过程中细菌群落结构的变化,分析环境因子对细菌群落结构的影响。邢钢等^[4]跟踪了 50、56℃和 61℃的低、中温和高温大曲制曲过程中的理化和生化指标,发现 3 种大曲各理化、生化指标变化趋势相似,而不同顶温对大曲的糖化力、液化力、酯化力、发酵力 4 个理化指标影响很大。冯佳婷等^[5]比较了相同原料、相同环境,制曲过程中顶温分别为 55℃和 65℃时成品曲的微生物、酶活和挥发性成分,结果发现发酵温度对大曲细菌群落影响更大,且高温曲的液化酶和糖化酶显著低于中温曲。同时,高温曲的挥发性化合物更为复杂,其中醛类化合物含量显著高于中温曲。在中、高温曲范围,陈可丹等^[6]分析了顶温为 58℃和 62℃的特香型大曲理化生化指标和微生物变化,两者的优势细菌为不同的乳酸菌,优势真菌类似均为嗜热子囊菌属(*Thermoascus*)和假丝酵母属(*Candida*),出房时高温曲的酸性蛋白酶活力、糖化力及酯化力略低。迄今为止,关于不同顶温发酵对大曲微生物群落、理化性质以及挥发性物质影响的报道大都集中在酱香型大曲和浓香型大曲^[7-12],对于低温范围

收稿日期: 2023-03-12

基金项目: 山西省自然科学基金项目(201901D111286);
山西省基础研究计划项目(202103021223255,
202203021221135)

第一作者: 王昊乾,男,硕士生

通信作者: 张秀红 E-mail: 2307203178@qq.com

内不同顶温对大曲微生物、主要理化生化指标的影响尚不清楚。本文以清香大曲中的红心曲为研究对象,在相同原料、相同环境下比较不同顶温对红心曲微生物群落结构和主要生理、生化指标的影响,为红心曲的标准化生产提供理论参考。

1 材料与方法

1.1 材料、试剂与仪器设备

1.1.1 试验材料 红心曲样品由内蒙古某清香型白酒厂提供。根据大曲发酵的顶温,将其分为 MT 和 LT 两个种类,MT 的顶温比 LT 高 5℃。每种顶温大曲从 3 个曲房取样,分别记作 MT1、MT2、MT3 和 LT1、LT2、LT3,MT1 和 LT1 为 5 个重复,其它为 3 个重复,共 22 个样品。将 6 个大曲砖样品粉末化,放入无菌袋中作为试验大曲粉末样品(300 g)。收集 6 个样品储存在 4℃用于分析物理化学和酶学性质(250 g)和 20℃用于 DNA 提取(50 g)。

1.1.2 试验主要试剂 可溶性淀粉、葡萄糖,天津市光复科技发展有限公司;3,5-二硝基水杨酸、酒石酸钾钠,天津市科密欧化学试剂有限公司;苯酚、冰乙酸、硫酸,天津市永大化学试剂有限公司;亚硫酸钠、氢氧化钠,天津市北辰方正试剂厂。

1.1.3 仪器与设备 电子分析天平(BSA224S),赛多利斯科学仪器(北京)有限公司;电热恒温水浴锅(DZKW-0-4),上海科恒实业发展有限公司;pH 计(PHS-3C),上海仪电科学仪器股份有限公司;数显可见分光光度计(722S),上海菁华科技仪器有限公司;恒温恒湿培养箱(ZXMP-R1230),上海智城分析仪器制造有限公司;台式离心机(Sorvall ST 16R),赛默飞世尔科技(中国)有限公司;磨粉机(HW-860W),广州旭朗机械设备有限公司。

1.2 方法

1.2.1 理化指标测定 大曲糖化力、液化力、发酵力、酒化力、酸度和水分的测定方法分别参考标准方法^[13-18]。糖化力定义为 1 h,1.0 g 大曲在 40℃、pH 4.6 下将可溶性淀粉水解为葡萄糖的量;液化力定义为 1 h,1.0 g 大曲在 60℃、pH 4.6 下将可溶性淀粉液化的量;发酵力定义为 0.5 g 大曲在 30℃下从可发酵糖中发酵 72 h 产生的 CO₂ 质量(g);

酒化力定义为 10%质量分数的大曲在 30℃下发酵底物 15 d 后产生的酒精的密度,根据馏出液的密度和温度,参照 GB/T 10345-2007 附录 A 换算 20℃时酒精的百分含量;使用在 110℃下的干湿法测量来测定大曲的水分;酸度采用滴定法,通过 0.1 mol/L NaOH 滴定测定,显示滴定终点 pH 值为 8.2。

1.2.2 高通量扩增子测序分析 DNA 的提取和 PCR 的扩增:按照制造商的说明,使用 E.Z.N.A.[®] Soil DNA Kit DNA 试剂盒(Omega Bio-Tek,Norcross,GA,United States)从 6 个大曲样品的微生物群落中提取基因组 DNA。PCR 反应体系含有以下物质:Phusion Hot start flex 2X Master Mix 12.5 μL,Forward Primer 2.5 μL,Reverse Primer 2.5 μL,Template DNA 50 ng,ddH₂O to 25 μL。真菌使用的引物为 ITS1FI2 (5'-GTGARTCATC-GAATCTTTG-3') 和 ITS2 (5'-TCCTCCGCT-TATTGATATGC-3') 对真菌(ITS2)可变区进行 PCR 扩增^[19]。对该基因进行 PCR 扩增:初始变性温度为 98℃,反应 30 s,54℃退火 30 s,在 72℃延伸 45 s,PCR 扩增循环 32 次;单一延伸在 72℃ 10 min;最终冷却至 4℃。细菌使用的引物是 341F (5'-CCTACGGGNGGCWGCAG-3') 和 805R (5'-GACTACHVGGGTATCTAATCC-3') 对细菌(V3-V4)片段进行 PCR 扩增^[20]。PCR 反应条件是:初始变性温度为 98℃,反应 30 s,54℃退火 30 s,在 72℃延伸 45 s,PCR 扩增循环 35 次;单一延伸在 72℃ 10 min;最终冷却至 4℃。PCR 扩增产物通过 2%琼脂糖凝胶电泳进行检测,并对目标片段进行回收,回收采用 AxyPrepPCRCleanupKit 回收试剂盒。

Illumina NovaSeq 测序纯化后的 PCR 产物采用 Quant-iTPicoGreendsDNAAssayKit 在 Qbit 荧光定量系统上对文库进行定量,合格的文库浓度应在 2 nmol/L 以上。将合格的上机测序文库(Index 序列不可重复)梯度稀释后,根据所需测序量按相应比例混合,并经 NaOH 变性为单链进行上机测序,使用 NovaSeq 测序仪进行 2×250 bp 的双端测序。

测序原始数据的处理 根据双端序列的重叠区,采用 Pear 将 R1、R2 序列拼接成长的 tag 序

列, 并使用 cutadapter 去除 barcode 以及引物序列。然后 Fqtrim 过滤低质量序列, 采用 Vsearch (v2.3.4) 过滤嵌合体。使用 DADMT 进行降噪后, 得到特征表和特征序列。Alpha 多样性和 Beta 多样性通过抽平 (将所有样本的序列数抽取至最少序列样本的序列数) 的方式进行归一化, 物种注释使用相对丰度来进行归一化处理 (X 菌群 count/总 count)。Alpha 多样性以及 Beta 多样性均由 QIIME2 流程分析, 图片由 R (v3.5.2) 包绘制。物种注释采用 QIIME2 的插件 feature-classifier 进行序列比对, 比对数据库为 SILVA 和 unite 数据库, 以 SILVA 数据库注释结果为准。

1.2.3 统计分析 所有数据均显示为 3 次测量的平均值 \pm 标准差。使用 SPSS 统计, 通过单因素方差分析 (ANOVA) 检验样本的统计显著性和平均值之间的差异, $P < 0.05$ 被认为具有统计显著性。群落结构图由 R Studio 软件构建。使用 UPGMA 对大曲样品进行聚类分析。

2 结果与分析

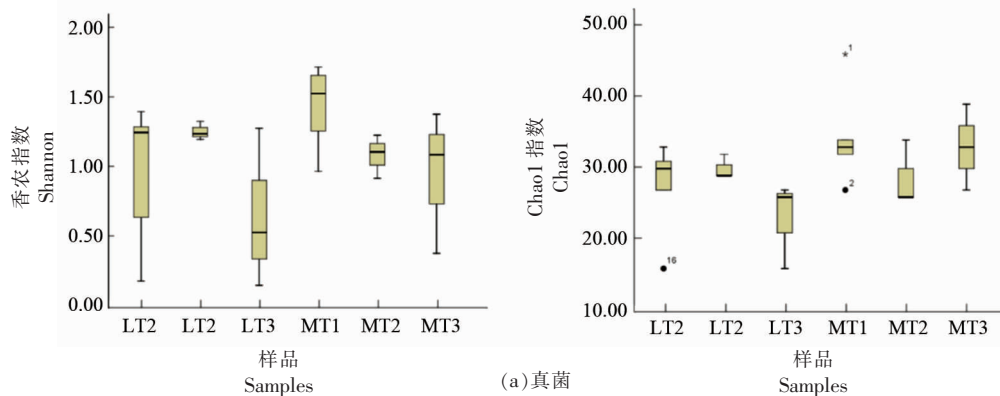
2.1 顶温对红心曲微生物 α 多样性的影响

不同顶温红心曲样品进行高通量测序后, Nova Miseq 测序获得的原始数据进行拼接质量控制处理后, 共得到有效的细菌序列 1 249 677 个, 有效的真菌序列 1 804 173 个。再进行优化后, 按照 97% 的相似性水平进行物种分类, 将其聚类分析集成到 OTU (操作分类单元) 中, 然后对 OTU 的代表性序列进行物种注释和其它分析。对细菌和真菌群落进行了 α 多样性分析, 所有样品的 Coverage 达到 1, 说明测序深度越合理, 测序深度已经基本覆盖到样品中所有的物种, 大曲样品的 Shannon

和 Chao1 指数结果见图 1。Shannon 是大曲微生物群落多样性的指标, 范围为 1~10, 一般数值越大, 表明微生物群落多样性越高。图 1 中可以看出, 真菌 Shannon 值较低, MT 组有一个 0.37 的异常值, 其中位数为 1.22, LT 组的中位数为 1.24, 两组几乎没有区别; 对于细菌而言, MT 组同样有一个异常值 6.59, 其中位数为 5.53, LT 组的中位数为 5.93, 两组没有显著性区别。Chao1 表示样品的丰富度, 与丰度、均匀度无关, 主要反映微生物菌种多少, 数值越大表示微生物种类越多。从图 1 中可以看出, 真菌 MT 组也有一个异常值 46.0, 其中位数为 29.0, LT 组中有一个异常值 16.0, 其中位数为 33.0, 两组没有显著性差异; 对于细菌而言, MT 组一个极端值 709.8, 其中位数为 302.1, LT 组中位数为 304.5, 两组几乎没有区别。整体来说, 所有红心曲样品细菌多样性要远高于真菌, 但不同顶温对于微生物多样性没有显著性影响。

2.2 顶温对红心曲微生物群落结构的影响

不同顶温红心曲样品扩增子高通量测序鉴定后, 按 97% 的相似性水平进行分类, 在门水平和属水平的群落结构见图 2, 其中图 2a 和图 2b 是门水平的真菌和细菌组成, 图 2c 和 2d 是属水平真菌和细菌组成各部。在门水平上, 不同顶温的红心曲的优势菌都是子囊菌门 (Ascomycota), 占真菌类群的 98.3%, 接合菌门 (Zygomycota) 次之, 占 1.6% (图 1a), 其余是极少量的担子菌门 (Basidiomycota) 和不能分类鉴定的真菌。除了占绝对优势的子囊菌外, 少量的接合菌门主要来自于 MT 样品, LT 样品中则极少发现。与真菌相比, 原核微生物在门水平就较为丰富, 所有样品的优势菌相同, 主要有厚壁菌门 (Firmicutes)、放线菌门 (Acti-



(a) 真菌

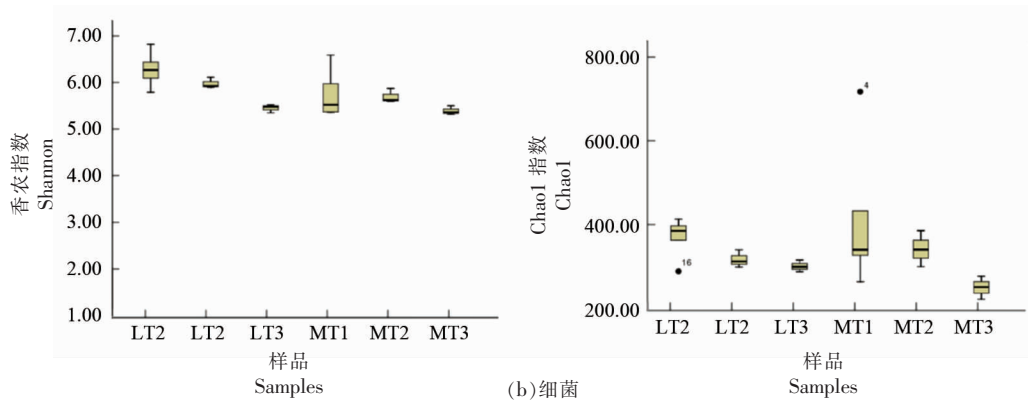


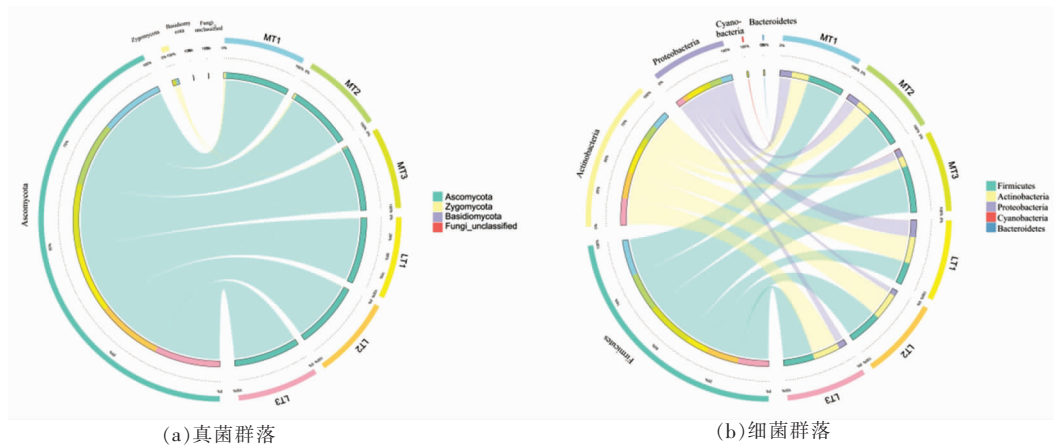
图1 顶温对红心曲微生物 α多样性的影响

Fig.1 Effect of peak-temperature on Hongxinqu microbial communities α-diversity

nobacteria)和变形菌门(Protobacteria),分别占总细菌种群的52.5%,31.1%和15.6%(图1b),还有极少量的蓝细菌门(Cyanobacteria)和拟杆菌门(Bactriodets)。

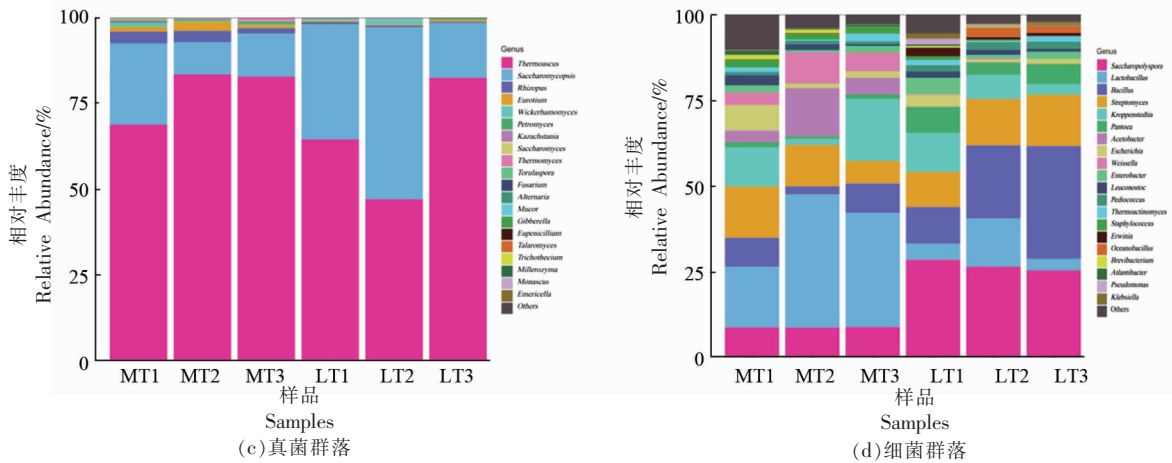
从不同顶温红心曲真菌群落结构图2c中可

以看出,在红心曲中绝对优势真菌是嗜热子囊菌(*Thermoascus*)和扣囊腹膜酵母(*Saccharomycopsis*)。顶温提高5℃后,MT中耐热的嗜热子囊菌由LT组中的64.7%增到78.4%,而不耐热的扣囊腹膜酵母则由LT组的33.3%降至MT组的15.2%。



(a)真菌群落

(b)细菌群落



(c)真菌群落

(d)细菌群落

图2 不同顶温红心曲的微生物群落结构

Fig.2 Microbial community structure of Hongxinqu made with different peak-temperature

嗜热子囊菌属能产生热稳定的水解酶,如纤维素酶和木聚糖酶,继而将谷物中的纤维素降解^[21],是大曲发酵不可或缺的重要菌属,已经在大多数大曲检测到是优势菌种。扣囊复膜酵母(*Saccharomycopsis fibuligera*),又称扣囊拟内孢霉(*Endomycopsis fibuligera*)能生淀粉液化酶和糖化酶,是产生淀粉分解酶类的最好的子囊酵母菌之一^[22],同时扣囊复膜酵母还具有一定的产香产酯能力,其最适发酵温度为 30℃左右^[23]。除此以外,MT 组中的根霉(2.7%)和曲霉(1.6%)的丰度要多于 LT 组中根霉(0.4%)和曲霉(0.4%)的丰度,根霉和曲霉是糖化力来源的重要菌种,有利于糖化酶的产生和积累。经过显著性分析(图 3a),MT 中的嗜热子囊菌、根霉和曲霉显著增加,扣囊腹膜酵母则显著减少,说明温度是大曲微生物选择的重要手段。

与真菌相比,红心曲细菌种类非常丰富。MT 中优势细菌属有乳杆菌属、醋酸菌属、魏斯氏菌属和葡萄球菌,LT 中优势细菌属有糖多孢菌属、芽孢杆菌属、泛菌属。两类大曲中都还有链霉菌属、克罗彭施泰特氏菌属、大肠埃希菌属、肠球菌属、明串珠菌属、片球菌属和嗜热放线菌属等。顶温升高 5℃后,最明显的变化是糖多孢菌从 LT 中的 26.7%降至 MT 中的 8.8%。糖多孢菌属放线菌,类似于其它放线菌,糖多孢菌可以合成多杀菌素类化合物的生物杀虫剂^[24]、大环内酯类红霉素等抗

生素,还因合成生物胺氧化酶而降低黄酒中的生物胺和参与氨基酸合成用于黄酒生产中等。但是,糖多孢菌在白酒酿造中不是主要功能菌,可能在大曲生产中产生一些水解酶类促进其它微生物生长,在一般大曲中比例都比较少。同时,乳杆菌属(*Lactobacillus*)从 LT 组中的 7.4%增加到 29.9%。乳杆菌属是酒醅中重要的乳酸菌,可代谢产生乳酸使酒醅 pH 值降低,抑制杂菌保障酒精发酵正常进行,同时乳酸还是成品酒的主要有机酸,乳酸与乙醇酯化形成乳酸乙酯也是成品酒主要香气成分^[25]。结过显著性分析,提高顶温除了显著降低糖多孢菌、增加乳杆菌外,显著性变化的还有醋酸菌、魏斯氏菌和葡萄球菌(图 3b)也显著增加。醋酸菌主要产物是乙酸,乙酸是成品酒中重要的风味物质,适宜的乙酸给白酒带来愉快的香和酸味,少酸的酒则可能有味淡和后味短的缺陷^[26]。魏斯氏菌是异型乳酸发酵的乳酸菌,也是酒醅中常见的细菌,其可合成 β -葡萄糖苷酶可降解纤维二糖产生葡萄糖,有利于酿酒原料的彻底利用,乳酸发酵还能产生乙酸、乙醇和乳酸,丰满酒的口感^[27]。葡萄球菌也是发酵食品中产香的微生物,尤其在发酵肉制品,能分解氨基酸、脂肪等产生小分子的醇和酸^[28]。顶温提高 5℃后,除了糖多孢菌外,显著降低的细菌还有泛菌和芽孢杆菌。泛菌是广泛存在于植物表面和种子中,能产生多种纤维素酶和木质素酶导致植物病害^[29],其最适生长温度为 28-30℃,

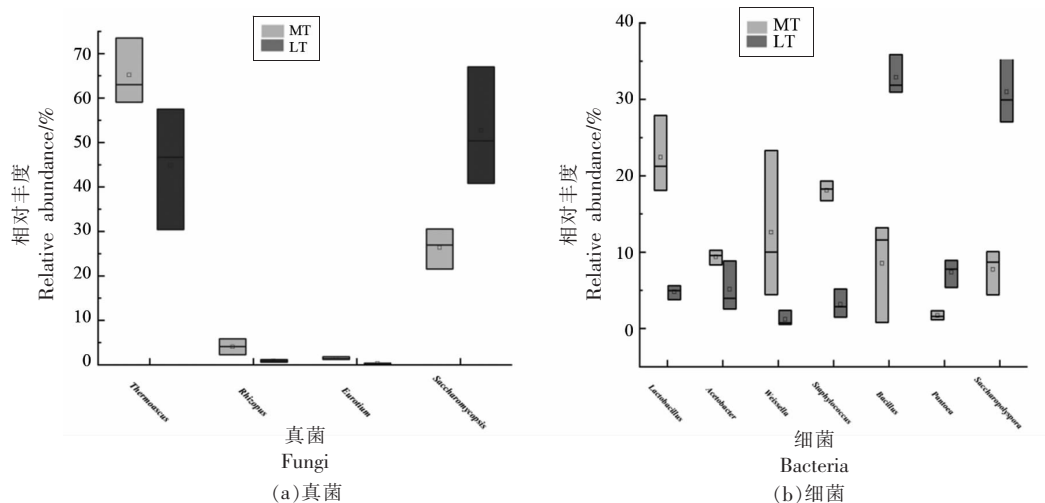


图 3 不同顶温红心曲显著性区别的微生物

Fig.3 Significance difference microbial for Hongxinqu made with different peak-temperature

40℃左右即为致死温度^[30],顶温提高后自然抑制了泛菌的生长。但是具有耐热耐湿的芽孢杆菌也显著减少,原因尚不清楚。都说明通过提高顶温是大曲制作中酿酒微生物群落结构优化的又一有效举措。

进一步使用UPGMA对6种红心曲样品进行聚类分析,结果见图4a和4b。从真菌聚类图4a中可以看到,除了MT3C、LT1C、LT3C和LT2C 4个

样品外,其余8个LT样品聚在一起,10个MT样品几乎全部聚在一起;从细菌聚类图4b可以看出,除了MT1D、MT1C、MT1E 3个样品外,其余MT的8个样品聚在一起,所有11个LT样品聚在一起。从真菌和细菌两类微生物群落结构看,MT和LT都明显分为两类,说明顶温升高5℃对红心曲足以产生明显不同的微生物群落结构。

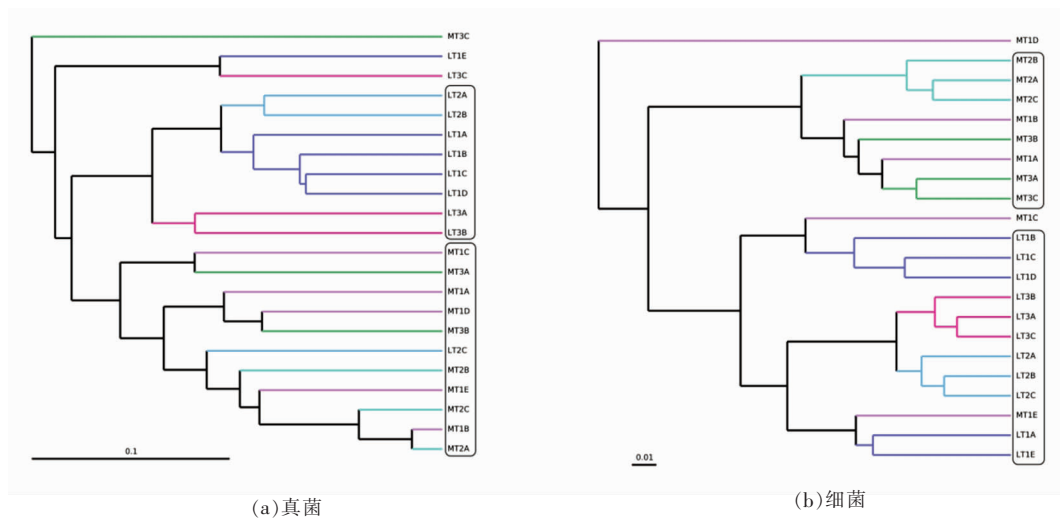


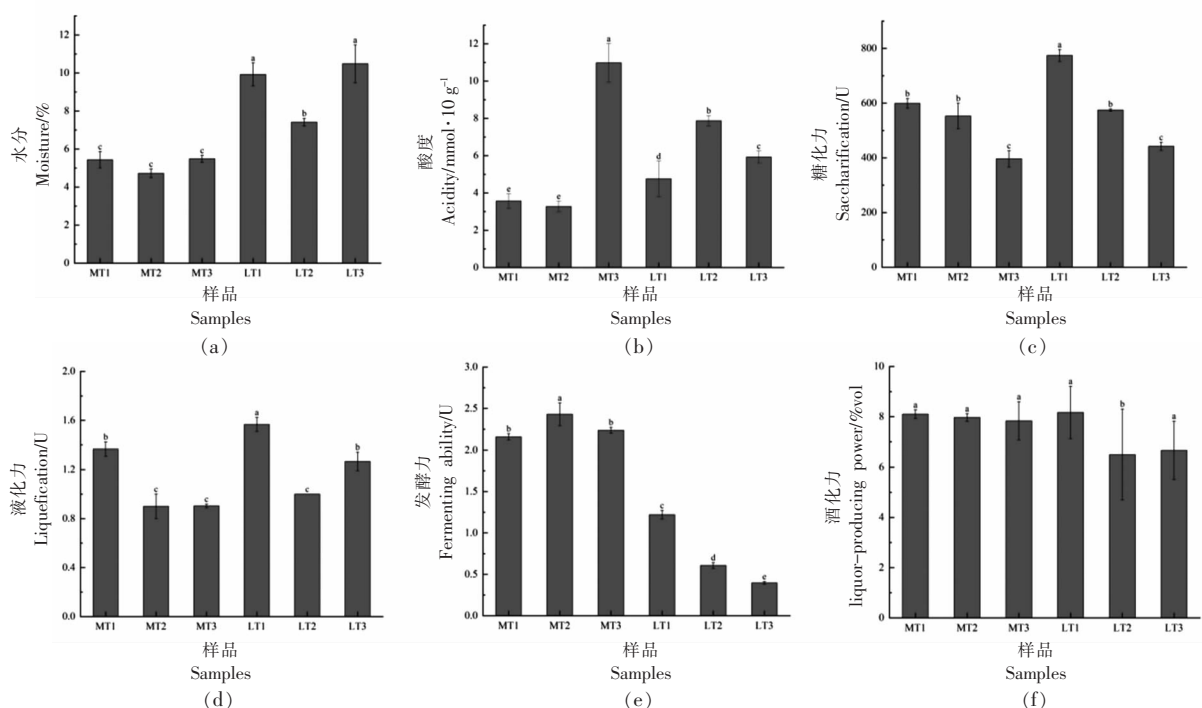
图4 不同顶温红心曲样品的聚类分析

Fig.4 Cluster analysis of Hongxinqu made with different peak-temperatures

2.3 顶温对红心曲理化性质的影响

生理生化是大曲质量评价的重要指标。常用于评价大曲的理化生化指标有糖化力、液化力、发酵力、酒化力、水分和酸度等。图5显示了原始样品中6种理化生化指标的差异(Duncan检验 $P < 0.01$)。水分是大曲能否出房的关键指标,一般大曲水分低于14%才允许结束发酵出房保存。试验中所有大曲样品水分都低于12%,达到水分要求,MT组的水分尤其低一些。酸度是大曲发酵综合程度的表现,大曲在早期酸度达以最高,之后逐渐降低,MT的酸度较低说明其发酵更彻底,与水分较低较为吻合。大曲是白酒酿造的糖化剂,糖化力和液化力是大曲作为糖化剂的重要指标,且大曲糖化酶与液化酶活力往往是同步的,即糖化力高的大曲液化力一般也高,本试验中所有样品的液化

力与糖化力变化趋势也相同。另外在一定温度范围内,大曲糖化力与发酵温度成反比,即发酵用温越高大曲糖化力越低,发酵用温偏低大曲糖化力就偏高^[31]。本试验中只有LT1的糖化力较高,其余样品的糖化力在400~600 U之间,不同曲房也有所区别,说明顶温升高对糖化力没有显著影响,一方面因为大曲是固态发酵,均一性不如液态发酵,另一方面也说明顶温升高5℃并没有引起糖化力显著性变化。发酵力是大曲产酒能力的间接表示,顶温升高后LT的发酵力为0.4~1.2 U,MT组的发酵力显著增加为2.2~2.4 U。MT和LT的酒化力区别没有发酵力大,但MT组的酒化力明显增加,与较高的发酵力相吻合。总体来讲,顶温升高后大曲的酿酒没有受到影响,甚至产酒能力更强一些。



注:abcd 为显著标记,相同的标记字母表示没有显著差异,不同的字母标记表示显著差异。

图 5 顶温对红心曲理化性质的影响

Fig.5 Effect of peak - temperature on physicochemical properties of Hongxinqu

3 讨论

红心曲是清香白酒酿造 3 种大曲中制作难度最大的单品曲。大曲微生物生长代谢产生并释放热量使曲坯和曲房温度提高,通过翻曲和开窗降低大曲温度,因此曲坯温度几乎一直处于波动状态。在清香白酒生产的典型地区汾阳,清茬曲热曲温度 44~46 ℃,晾曲温度为 28~30 ℃;后火曲热曲温度 46~48 ℃,晾曲温度为 30~32 ℃;红心曲热曲温度 45~47 ℃,晾曲温度为 34~38 ℃^[32]。可以看出,红心曲热曲温度不是很高,但晾曲温度最高,尤其在“座火”期,要控制好温度,还要保持湿度^[33]。可见温度对于红心出现的重要性。在内蒙古地区,由于环境温度差别较大,常年气温较汾阳地区低,大曲培养又是开放培养,温度控制也需要相应调整。对于红心曲生产中,提高热曲温度(顶温)有利于消除较低外界温度的影响,保障其曲心温度处于理想的热曲和晾曲温度范围内。事实上,顶温提高 5 ℃以后,红心曲的红心率提高了 20%左右。

温度是微生物生长繁殖最重要的影响因素。大曲制作中也是微生物筛选的有效条件。酱香大

曲制做中顶温要超过 60 ℃,其微生物主要以耐热的芽孢杆菌为主,也称细菌曲^[34]。清香大曲制作温度相对较低,被认为是霉菌曲。在清香大曲制作中小范围的温度调整,也会影响大曲微生物的选择。本试验中,红心曲制作中顶温提升 5 ℃,其绝对优势真菌嗜热子囊菌显著增加,红心曲的红心率相应提高了 20%,由此可推测嗜热子囊菌是红心曲的关键核心微生物,同时显著增加的霉菌还有曲霉和根霉,都能产生大量淀粉酶^[35],为大曲贡献糖化力,是酿酒功能菌。对于原核微生物,顶温升高显著增加了醋酸菌、魏斯氏菌和葡萄球菌等能产生各种有机酸、氨基酸等有助于白酒的风味物质^[36],因此,小幅提升顶温有利于红心曲的功能微生物生长代谢和产物积累。

大曲是酿酒的糖化剂,大曲生理生化指标是大曲质量评价的重要指标。不同顶温发酵对于大曲的微生物群落以及理化性质的影响较大,如高温大曲糖化力、液化力较低,产香产酯较强,低温大曲糖化力、液化力较高,产香能力稍弱^[37]。这与高温大曲与低温大曲温度相差较大有关。本试验

中,红心曲顶温略有提升,却是有利于淀粉酶产生菌的增加,所以没有显著降低大曲的糖化力和液化力;相反,由于增加醋酸菌、魏斯氏菌等产生CO₂的菌,显著增加了发酵力,酒化力也少有增加,顶温适当提高有助于从生理生化指标方面改善红心曲质量。

4 结论

1) 本试验结合当地实际情况,将红心曲制曲过程的顶温升高5℃,以弥补较低的环境温度,保障晾曲温度在适宜的范围内,使红心曲的红心率明显提高。

2) 红心曲制作过程中适当提高顶温,改变了微生物的群落结构,如伴随绝对优势的嗜热子囊菌增加而增加的红心率,可推测嗜热子囊菌为红心曲的关键核心微生物;另外真核微生物中曲霉、根霉的显著增加,原核中的醋酸菌、魏斯氏菌和葡萄球菌的增加,糖多孢菌的显著减少,都说明在常年气温较冷的地区适当提高顶温可筛选优化酿酒功能菌。

3) 适当提高红心曲顶温,并没有降低大曲关键生理生化指标糖化力和液化力,反而由于有益微生物的增加,进一步改善了红心曲的综合质量。为红心曲的标准化生产提供了理论和实践依据。

参 考 文 献

- [1] WANG H Y, GAO Y B, FAN Q W, et al. Characterization and comparison of microbial community of different typical Chinese liquor Daqus by PCR-DGGE[J]. *Letters in Applied Microbiology*, 2011, 53(2): 134-140.
- [2] ZHANG L Q, WU C D, DING X F, et al. Characterisation of microbial communities in Chinese liquor fermentation starters Daqu using nested PCR-DGGE[J]. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 2014, 30(12): 3055-3063.
- [3] 姚亚林, 邓杰, 任志强, 等. 不同品温大曲及其曲房空气的细菌群落变化规律和相关性[J]. *现代食品科技*, 2021, 37(3): 62-69.
YAO Y L, DENG J, REN Z Q, et al. Variations and correlation between bacterial communities in Daqu and the workshop air at different temperatures [J]. *Modern Food Science and Technology*, 2021, 37(3): 62-69.
- [4] 邢钢, 敖宗华, 王松涛, 等. 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.
XING G, AO Z H, WANG S T, et al. Analysis of the change in physiochemical indexes during the production process of Daqu of different temperature [J]. *Liq-mak Sci Technol*, 2014(6): 20-23.
- [5] 冯佳婷, 陆震鸣, 时伟, 等. 不同培养温度对大曲微生物群落结构、酶活及挥发性化合物的影响[J]. *应用与环境生物学报*, 2021, 27(3): 760-767.
FENG J T, LU Z M, SHI W, et al. Effects of different culture temperatures on microbial community structure, enzyme activity, and volatile compounds in Daqu [J]. *Chin J Appl Environ Biol*, 2021, 27(3): 760-767.
- [6] 陈可丹, 吴晓江, 陈延儒, 等. 顶温对特香型大曲理化指标及菌群演替的影响[J]. *食品与发酵工业*, 2020, 46(5): 52-58.
CHEN K D, WU X J, CHEN Y R, et al. Effect of peak temperature on the succession of physicochemical index and microbial community of special-flavor Daqu [J]. *Food and Fermentation Industries*, 2020, 46(5): 52-58.
- [7] FU G M, DENG M F, CHEN K D, et al. Peak-temperature effects of starter culture (Daqu) on microbial community succession and volatile substances in solid-state fermentation (Jiupei) during traditional Chinese special-flavour Baijiu production [J]. *LWT*, 2021, 152: 112132.
- [8] 李燕荣, 杨勇, 张龙云, 等. 中高温大曲发酵过程微生物消长规律探析[J]. *酿酒科技*, 2019(5): 89-93.
LI Y R, YANG Y, ZHANG L Y, et al. Microbial growth/decline rules in the fermentation process of medium/high-temperature Daqu [J]. *Liq-mak Sci Technol*, 2019(5): 89-93.
- [9] 樊建辉, 侯建光, 郭福祥, 等. 仰韶超高温大曲发酵过程中微生物变化的初步分析[J]. *酿酒*, 2015, 42(1): 49-51.
FAN J H, HOU J G, GUO F X, et al. Preliminary analysis of the change of microbes in the fermentation of process of super high temperature Daqu in

- Yangshao winery[J]. *Liquor Making*, 2015, 42(1): 49-51.
- [10] 常强, 吴再节, 孙伟, 等. 不同培养温度对大曲微生物种群变化影响的研究[J]. *现代食品*, 2019(12): 63-65, 78.
- CHANG Q, WU Z J, SUN W, et al. Effects of different culture temperature on microbial population change in Daqu[J]. *Mod Food*, 2019(12): 63-65, 78.
- [11] 陈勇, 陈泽军, 周瑞平, 等. 大曲制曲过程中挥发性组分变化规律的研究[J]. *酿酒科技*, 2012(10): 35-39.
- CHEN Y, CHEN Z J, ZHOU R P, et al. Study on the change rules of volatile components in Daqu-making process[J]. *Liq-mak Sci Technol*, 2012(10): 35-39.
- [12] 印璇, 冯英志, 韩兴林, 等. 北方酱香大曲培曲过程中微生物变化的分析研究[J]. *酿酒科技*, 2015(1): 1-6, 11.
- YIN X, FENG Y Z, HAN X L, et al. Change of microbes in Daqu culture process of Jiangxiang Daqu in North China[J]. *Liq-mak Sci Technol*, 2015(1): 1-6, 11.
- [13] 马歌丽, 魏泉增, 张志刚. 分光光度法测定大曲糖化酶活力探讨[J]. *中国酿造*, 2008(17): 69-71.
- MA G L, WEI Q Z, ZHANG Z G. Determination of the glucoamylase activity of Daqu by DNS[J]. *China Brewing*, 2008(17): 69-71.
- [14] 刘璐. 大曲液化酶活力测定方法比较分析[J]. *化工管理*, 2020(23): 33-34.
- LIU L. Comparative analysis of methods for determining liquefying enzyme activity of Daqu[J]. *Chemical Management*, 2020(23): 33-34.
- [15] 万春环, 李红歌, 王二徐, 等. 影响浓香型大曲发酵力测定的因素探讨[J]. *酿酒*, 2014, 41(3): 79-81.
- WAN C H, LI H G, WANG E X, et al. Discussions on the influence factors of determination of fermentation activity of Luzhou-flavor Koji[J]. *Liquor Making*, 2014, 41(3): 79-81.
- [16] 沈才洪, 许德富, 沈才萍, 等. 大曲质量标准的研究(第一报): 大曲“酒化力”的探讨[J]. *酿酒科技*, 2004(3): 22-23.
- SHEN C H, XU D F, SHEN C P, et al. Research on Daqu quality standard(I) investigation on Daqu ‘Liquor-producing power’[J]. *Liq-mak Sci Technol*, 2004(3): 22-23.
- [17] 张艳, 杨诗腾, 孙珍坤. 纯粮固态大曲现有水分测定方法的探讨与分析[J]. *酿酒*, 2020, 47(3): 72-75.
- ZHANG Y, YANG S T, SUN Z K. Discussion and analysis of existing moisture determination methods in pure grain Daqu[J]. *Liquor Making*, 2020, 47(3): 72-75.
- [18] 刘建芝, 沙均响, 李嘉琪, 等. 中和法测定大曲酸度方法探讨[J]. *酿酒*, 2018, 45(3): 104-106.
- LIU J Z, SHA J X, LI J Q, et al. Discussion on neutralization method for determination of acidity in Daqu[J]. *Liquor Making*, 2018, 45(3): 104-106.
- [19] KARLSSON I, FRIBERG H, STEINBERG C, et al. Fungicide effects on fungal community composition in the wheat phyllosphere[J]. *PLoS one*, 2014, 9(11): e111786.
- [20] LOGUE J B, STEDMON C A, KELLERMAN A M, et al. Experimental insights into the importance of aquatic bacterial community composition to the degradation of dissolved organic matter[J]. *ISME J*, 2016, 10(3): 533-545.
- [21] 李晓丽, 涂涛, 姚斌, 等. 嗜热子囊菌 JCM12803 来源的双功能木聚糖/纤维素酶[J]. *生物工程学报*, 2018, 34(12): 1996-2006.
- LI X L, TU T, YAO B, et al. A novel bifunctional xylanase/cellulase TcXyn10A from *Thermoascus crustaceus* JCM12803[J]. *Chin J Biotech*, 2018, 34(12): 1996-2006.
- [22] 颜华. 扣囊复膜酵母(*Saccharomycopsis fibuligera*)代谢工程的研究[D]. 北京: 中国科学院微生物研究所, 2007.
- YAN H. Study on metabolic engineering of *Saccharomycopsis fibuligera*[D]. Beijing: Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, 2007.
- [23] 苏畅, 马莹莹, 杨建刚. 扣囊复膜酵母在酿酒中的应用研究进展[J]. *食品研究与开发*, 2018, 39(1): 205-209, 220.
- SU C, MA Y Y, YANG J G. Research progress of *Saccharomycopsis fibuligera* in liquor-making industry[J]. *Food Research and Development*, 2018, 39(1): 205-209, 220.
- [24] HE H, TANG J, CHEN J, et al. Flaviolin-like gene cluster deletion optimized the butenyl-spinosyn biosynthesis route in *Saccharopolyspora pogona* [J]. *ACS Synth Biol*, 2021, 10(10): 2740-2752.

- [25] 赵皓静, 冯婧熙, 王晓丹, 等. 一株耐酸乳杆菌 *Lactobacillus acetotolerans* FBKL1.0204 的筛选鉴定及耐酸、产酸特性[J]. 食品与发酵工业, 2022, 48(19): 50-57.
- ZHAO H J, FENG J X, WANG X D, et al. Screening and identification of *Lactobacillus acetotolerans* FBKL1.0204 and its acid tolerance and production characteristics[J]. Food and Fermentation Industries, 2022, 48(19): 50-57.
- [26] WANG C Y, ZHANG J, GUI Z Z. *Acetobacter* bacteria are found in Zhenjiang vinegar grains[J]. Genet Mol Res, 2015, 14(2): 5054-5064.
- [27] TEIXEIRA C G, FUSIEGER A, MILIAO G L, et al. *Weissella*: An emerging bacterium with promising health benefits [J]. Probiotics Antimicrob Proteins, 2021, 13(4): 915-925.
- [28] 段雨帆, 钟媛媛, 朱霄, 等. 葡萄球菌对发酵肉制品中生物胺降解机制研究进展[J]. 肉类研究, 2022, 36(1): 49-55.
- DUAN Y F, ZHONG Y Y, ZHU X, et al. Progress in understanding the degradation mechanism of biogenic amines in fermented meat products by *Staphylococcus*[J]. Meat Research, 2022, 36(1): 49-55.
- [29] WALTERSON A M, STAURINIDES J. *Pantoea*: Insights into a highly versatile and diverse genus within the *Enterobacteriaceae* [J]. FEMS Microbiol Rev, 2015, 39(6): 968-984.
- [30] YAN Z, YIN L, HAO C, et al. Synergistic effect of pulsed electric fields and temperature on the inactivation of microorganisms[J]. AMB Express, 2021, 11(1): 47.
- [31] 王广峰. 清香型大曲工艺特点及其质量改进[J]. 酿酒, 2011, 38(2): 60-61.
- WANG G F. Technological characters and quality improvement of fen flavor liquor[J]. Liquor Making, 2011, 38(2): 60-61.
- [32] 张晓东. 谈汾酒大曲培制要点的把控[J]. 酿酒, 2021, 48(3): 36-37.
- ZHANG X D. Discussion on the control of key points in Fenjiu Daqu making[J]. Liquor Making, 2021, 48(3): 36-37.
- [33] 刘昌录, 魏耀成, 任润斌. 汾酒红心曲制作“三要诀”[J]. 酿酒科技, 2012(6): 73-75.
- LIU C L, WEI Y C, REN R B. Three tips in the production of red core starter for Fenjiu[J]. Liq-mak Sci Technol, 2012(6): 73-75.
- [34] 唐佳代, 刘力萍, 龙亚飞, 等. 不同感官特性酱香大曲细菌群落结构与理化特性研究[J]. 中国酿造, 2022, 41(1): 138-142.
- TANG J D, LIU L P, LONG Y F, et al. Bacterial community structure and physicochemical characteristics of sauce-flavor Daqu with different sensory characteristics [J]. China Brewing, 2022, 41(1): 138-142.
- [35] 南小华, 李牧, 陈福生. 高产糖化酶根霉菌株的筛选、鉴定及其在孝感米酒中的应用[J]. 中国酿造, 2018, 37(9): 88-93.
- NAN X H, LI M, CHEN F S. Screening and identification of *Rhizopus* strain with high-yield glucoamylase and its application in Xiaogan rice wine [J]. China Brewing, 2018, 37(9): 88-93.
- [36] 冯荆舒, 张荣, 高献礼, 等. 醋醅中优良醋酸菌的分离筛选及性能研究[J]. 食品与发酵工业, 2023, 49(1): 95-100.
- FENG J S, ZHANG R, GAO X L, et al. Screening, identification and characteristic of excellent acetic acid bacteria from vinegar fermented grains[J]. Food and Fermentation Industries, 2023, 49(1): 95-100.
- [37] 张清玫, 赵鑫锐, 李江华, 等. 不同香型白酒大曲微生物群落及其与风味的相关性[J]. 食品与发酵工业, 2022, 48(10): 1-8.
- ZHANG Q M, ZHAO X R, LI J H, et al. The relationship between microbial community and flavors of three types of Daqu[J]. Food and Fermentation Industries, 2022, 48(10): 1-8.

Effect of Peak-temperature on the Microbial Community Structure and Physicochemical Properties of Hongxinqu

Wang Haoqian¹, Liu Changlu³, Gu Tiegang³, Ren Xiaozhuang¹, Tang Yijing¹, Zhang Xiuhong^{2*}

¹College of Life Science, Shanxi Normal University, Taiyuan 030002

²College of Food Science, Shanxi Normal University, Taiyuan 030002

³Inner Mongolia Aer 1198 Wine Industry Co., Ltd., Ulanhot 137400, Inner Mongolia)

Abstract Temperature is used for classifying Daqu as high temperature Daqu, medium temperature Daqu and low temperature Daqu, since it significantly affects the physical and chemical indexes and microbial community structure of Daqu. The effect of temperature varied in a small range during the manufacture of Daqu for Light-flavor baijiu brewing on its microbial and physicochemical properties is still unclear. In this study, the effect of microbial community structure and physicochemical properties of Hongxinqu by different peak-temperature were compared. The results showed that there was no significant difference in microbial alpha diversity between the two groups of Hongxinqu from different peak temperature. However, the microbial community structure at the genus level has changed significantly. In Hongxinqu samples from peak-temperature risen 5 °C, *Thermoascus* increased from 64.7% to 78.4%, and *Saccharomycopsis fibuligera* decreased from 33.3% to 15.2%, *Eurotium* and *Rhizopus* producing amylases were also significantly increased. Similarly, in Hongxinqu samples from peak-temperature risen 5 °C, several bacteria genus significantly increased included *Acetobacter*, *Weissella*, and *Staphylococcus*, all of which were beneficial to the formation of Baijiu flavor, while Actinomycete *Saccharopolyspora* which is little in general Daqu samples decreased from 26.7% to 8.8%. About of the physicochemical properties, when the peak-temperature increased by 5 °C, the saccharification of Daqu decreased from 596.9 U to 516.1 U and the liquefaction decreased from 1.26 U to 1.05 U, but the decrease was not significant; The fermenting power and liquor-producing power have increased, with the fermenting power increasing from 0.74 U to 2.27 U and the liquor-producing power increasing from 7.1% vol to 8% vol. About of the physicochemical properties, the temperature increment of a small range did not significantly reduce the saccharification power and liquefaction power, while the fermenting power and liquor-producing power were increased. The overall results showed that increase of peak-temperature during Hongxinqu making process according to the actual situation can effectively optimize the microbial community structure of Hongxinqu and improve its comprehensive quality, which provided a theoretical basis for Hongxinqu production of high quality and highyield.

Keywords Hongxinqu; peak-temperature; microbial community; physicochemical properties