

米香型白酒小曲发酵酒醅微生物群落演绎与理化因子的相关性

李 信, 饶文俊, 胡 帅, 欧阳玲花, 祝水兰, 周巾英*

(江西省农业科学院农产品加工研究所 南昌 330200)

摘要 为了探究米香型白酒小曲发酵酒醅微生物群落演绎与理化因子的相关性, 分别测定发酵第 0,1,2,3,4,5,6,7,8,15,22,29,36,43,50,64,94 天的理化指标和微生物群落变化情况。结果表明,在发酵阶段,pH 值呈先减小后增加再减小的趋势,发酵结束后 pH 值约为 4.1,总酸则呈逐渐增加的趋势。淀粉含量在发酵前期迅速被水解消耗,发酵后期趋于平缓;还原糖含量在发酵 0~2 d 内呈增加趋势,在第 2 天达到最大值约为 180.14 g/L,在 2~15 d 内被微生物利用,其含量迅速降低。在发酵前期(0~3 d)未产生酒精度,发酵 22 d 时,酒精度达到最大值为 9.5°,而发酵后期酒精度降低;总酚含量则随着发酵时间的延长呈现上升趋势,最终发酵结束后含量为 375.63 mg GAE/L。在发酵过程中,变形菌门和厚壁菌门为主要优势菌门,主要优势菌属是肠杆菌属、泛菌属、片球菌属和乳球菌属。主坐标分析结果显示:所有样品在 PCoA 图上分为 6 个集群,由冗余分析(RDA)可知乳球菌属,假单胞菌属和片球菌属与总酸呈正相关性,泛菌属、阪崎肠杆菌属、肠杆菌属和克雷伯菌属与总酸呈负相关,而泛菌属、阪崎肠杆菌属、肠杆菌属和克雷伯菌属与 pH 值、淀粉和还原糖呈正相关,且总酸对优势菌属的影响力最大,pH 值、淀粉和还原糖对优势菌属的影响较为相似。

关键词 米香型白酒; 理化因子; 微生物; 冗余分析

文章编号 1009-7848(2024)10-0384-10 **DOI:** 10.16429/j.1009-7848.2024.10.035

白酒是我国传统的蒸馏酒,被列为世界六大名酒之一^[1]。按香型分类,浓香型、清香型、酱香型和米香型为中国白酒四大基本香型,其中米香型白酒以大米为原料,小曲为糖化发酵剂,经米饭固态培菌糖化、加水半液态发酵以及蒸馏而成^[2-3]。酒醅是微生物发酵及白酒产香的主要载体,在白酒酿造中发挥重要作用。酒醅在发酵过程中,理化因子和微生物之间存在一定的联系。有研究表明理化因子对微生物群落有调控作用,如 Tao 等^[4]研究发现 pH 值对不同的菌群影响不同。Zhang 等^[5]研究发现酒精和淀粉含量在微生物群落演绎过程中起重要作用;Hu 等^[6]研究发现总酸在发酵过程中对菌群呈正相关影响。

近年来,有许多采用高通量测序技术研究酒醅微生物群落结构的文献。如:Wang 等^[7]采用高通量测序方法研究酱香白酒中的微生物多样性,结果表明酒醅中特征细菌属为类芽孢杆菌(*Paeni-*

bacillus)和黄杆菌属(*Flavobacterium*)等。雷振河^[8]通过高通量测序技术分析清香型白酒酒醅,研究发现酒醅中的优势菌群有厚壁菌门(Firmicutes)和变形菌门(Proteobacteria)。肖琴等^[9]采用高通量测序对不同窖龄及不同位置浓香型白酒窖泥的微生物群落多样性进行分析,发现所有样品中,原核微生物共检出 37 个门、83 个纲、176 个目、306 个科、629 个属,其中优势菌门 5 个,各样品的差异微生物是在白酒酿造过程中发挥着重要作用的物种。然而,采用高通量测序技术分析米香型白酒小曲发酵过程中微生物群落结构的研究较少,对发酵过程中理化因子与哪些菌群存在互作关系更是鲜有报道。本文以米香型白酒小曲发酵的粮醅为研究对象,采用高通量测序技术解析细菌群落组成与多样性。结合酒醅中各理化因子的动态变化规律,分析微生物群落与理化指标的关系,以期为阐明米香型白酒小曲发酵过程各因素的变化机理提供理论参考。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

M1: 粳米 1 号,来自于江西省超级水稻研究中心。

收稿日期: 2023-10-17

基金项目: 江西现代农业科研协同创新专项
(JXXTCXQN202215)

第一作者: 李信,男,硕士,助理研究员

通信作者: 周巾英 E-mail: olina2012@126.com

氢氧化钠、硫酸铜、酒石酸钾钠、没食子酸、碳酸钠、福林酚、酚酞、乙醇等,阿拉丁公司;Q5®高保真DNA聚合酶,美国NEB公司;高灵敏度DNA试剂盒,安捷伦科技有限公司;荧光核酸定量染料,琼脂凝胶电泳缓冲液,琼脂糖凝胶,美国Invitrogen公司;DNA凝胶回收试剂盒,爱思进生物技术(杭州)有限公司;DNA建库试剂盒和测序试剂盒,美国Illumina公司。

1.2 仪器与设备

紫外分光光度计,德国Eppendorf公司;PCR扩增仪,美国ABI公司;酶标仪,美国BioTek公司;电泳仪,北京六一生物科技有限公司;凝胶成像系统,北京百晶生物有限公司;Marker,宝日医生物技术(北京)有限公司;Nanodrop,赛默飞世尔科技有限公司;TBS380荧光计,美国PROMEGA公司;2100生物分析仪,安捷伦科技有限公司;NovaSeq测序平台,美国Illumina公司。

1.3 试验方法

1.3.1 米香型白酒的制备 米香型白酒制备工艺流程:大米→清洗→浸泡→蒸煮→冷却→接曲→装缸→加水→发酵→蒸馏→米香型白酒。

大米经过清洗、浸泡、蒸煮、冷却后接曲,混匀,装缸,经过48 h糖化后加水发酵,发酵完成后蒸馏即得米香型白酒。分别取第0,1,2,3,4,5,6,7,8,15,22,29,36,43,50,64,94天的酒醅测定发酵过程中理化指标的变化情况。微生物的测定在糖化阶段取样测定(M1F1和M1F2分别为糖化第1天和糖化第2天),M1F3~M1F9分别代表第0,1,2,3,4,5,6,7,8天的发酵过程中微生物测定样品,发酵中期(15,22,29,36 d)和发酵末期(43,50,64,94 d)分别进行混合取样,其微生物的命名分别为M1F38和M1F96。

1.3.2 pH值的测定 pH值的测定参照张明珠等^[10]方法并稍作修改。量取酒醅20 mL,离心。用校准好的pH计测量,每个样品重复测定3次,记录数值。

1.3.3 酒精度的测定 采用酒精计法,参考国标《酒精计法》(GB/T 10345-2007)。

1.3.4 还原糖的测定 还原糖含量参照《食品安全国家标准 食品中还原糖的测定》(GB/T 5009.7-2016)方法。

1.3.5 总糖的测定 使用DNS法(3,5-二硝基水杨酸法)^[11],具体操作如下:

标准曲线测定:称取6 mg葡萄糖溶解在5 mL蒸馏水中,然后取50 μ L溶解在5 mL水中,得到质量浓度1 mg/mL的标准溶液,分别取0,0.1,0.2,0.3,0.4,0.5 mL的标准溶液加水至0.5 mL,加入1 mL DNS试剂,煮沸5 min后取出,最后加入4.5 mL蒸馏水,在波长540 nm处测定吸光度值。

样品测定:取0.1 mL离心后的酒样加水至0.5 mL,加入1 mL DNS试剂,煮沸5 min,取出,加入4.5 mL蒸馏水,在波长540 nm处测定吸光度值。

1.3.6 总酸的测定 参照王福荣^[12]的方法并稍作修改。取20 mL酒样,离心过滤取上清液,然后滴加3滴酚酞指示剂,用0.1 mol/L氢氧化钠滴定至溶液变为粉红色,30 s不变色,记录消耗氢氧化钠的体积。

1.3.7 活性物质总酚的测定 采用福林酚法^[13],具体操作如下:

标准曲线测定:将5 mg没食子酸溶解于5 mL水中,得到1 000 mg/L的标准溶液。取0.5 mL上述溶液溶解于5 mL水中得到100 mg/L的标准溶液中,依次取0,0.05,0.1,0.15,0.2,0.25 mL上述标准溶液加水至3 mL,然后加入0.5 mL福林酚和1.5 mL碳酸钠(20%),避光反应25 min,在波长765 nm处测定其吸光度。

样品测定:取0.1 mL离心后的酒样加水至3 mL,然后加0.5 mL福林酚和1.5 mL碳酸钠(20%),避光反应25 min后,在波长765 nm处测定其吸光度。

1.4 微生物群落分析

1.4.1 取样 采用九点取样法取样^[14],每个缸选择上、中、下3层取样,每层选中间及两角为取样点,共9个点取样。分别取不同时间段的酒醅样,-80 $^{\circ}$ C冷冻备用。

1.4.2 微生物总DNA提取 采用DNA提取试剂盒(美国Omega Bio-Tek公司),按照试剂盒说明书提取总DNA,并作标记。对提取的DNA进行0.8%琼脂糖凝胶电泳,判断分子大小,并利用紫外分光光度计对DNA进行定量,所有样品均需满足测序要求,将合格的DNA委托武汉百易汇能生物科技有限公司进行高通量测序。

1.4.3 PCR 扩增 PCR 扩增选用细菌 16Sr DNA V3-V4 区特异性引物,338F (5'-barcode+ACTCCTACGGGAGGCAGCA-3')806R(5'-GGACTACHVGGGTWTCTAAT-3')。前引物中的 barcode 是一个 7 个碱基的寡核苷酸序列,用来区分同一文库中的不同样品。

扩增程序:首先,在 PCR 仪上让 DNA 变性(98 ℃预变性 30 s),然后,进入 25~27 个扩增循环(98 ℃变性 15 s,50 ℃退火 30 s,72 ℃延伸 30 s,积累大量的 DNA 片段),最后,在 72 ℃保持 5 min,使产物延伸完整,于 4 ℃保存。

1.4.4 高通量测序 采用 Illumina 公司的 TruSeq Nano DNA LT Library Prep Kit 制备测序文库,构建好的文库在 Agilent Bioanalyzer 上质检,采用 Quant-iT PicoGreen dsDNA Assay Kit 在 Promega QuantiFluor 荧光定量系统定量。将合格的文库梯度稀释,所需测序量按相应比例混合,并经 NaOH 变性为单链进行 Illumina NovaSeq 双端测序,得到原始下机序列。建库与测序均在武汉百易汇能生物科技有限公司完成。

1.5 数据处理

采用 SPSS 19.0 软件进行统计分析,数据结果为“平均值±标准差”(n=3),以 Duncan 法进行显著性分析,P<0.05 为显著性差异。

2 结果与分析

2.1 大米发酵过程中总酸、pH 值变化

酒醅的 pH 值是保证正常发酵的一大重要因素^[15]。从图 1 可以看出,0~3 d,pH 值逐步降低,可能是因为酵母菌在此期间增殖并产生大量的二氧化碳,导致 pH 值快速降低。4~15 d,pH 值缓慢增加,变化幅度相比前期变小,其原因主要是酒醅中的氧气被消耗完,酵母从有氧生长阶段进入无氧发酵产酒精阶段。在 50~94 d,pH 值降低,发酵趋于停止,此时发酵液中的乳酸菌等厌氧或兼性厌氧菌再生长,产生有机酸,如乳酸、醋酸等,使 pH 值下降^[16]。白酒在酒缸内发酵主要是一个微生物代谢过程,适宜的酸度对微生物的生长和代谢是必要的,酸度过高或过低都会对微生物产生不利影响,因此,在发酵过程中必须控制酒醅的酸度在适宜的范围^[17]。发酵过程中,总酸含量呈现逐渐增

加的趋势(图 1),可以看出,0~8 d 期间,酒中的总酸含量逐渐增加,而 8~15 d 期间,酒中的总酸含量降低,可能是因为在前期阶段细菌产生的酸与酵母菌产生的醇发生反应,生成酯类化合物,从而导致总酸含量降低。这与前面 pH 值的变化一致^[18]。

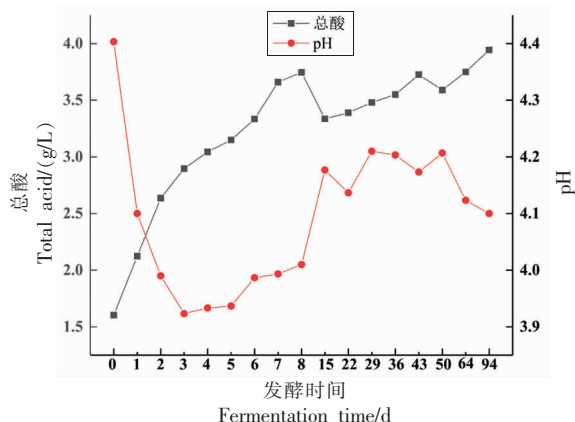


图 1 发酵过程总酸、pH 值变化

Fig.1 The changes in total acid and pH during fermentation

2.2 大米发酵过程中淀粉、还原糖的变化

在发酵过程中,淀粉为微生物生长繁殖提供主要碳源,淀粉首先在酒曲糖化酶的作用下水解为葡萄糖和其它单糖,再经酵母等转化为乙醇^[19]。如图 2a 所示,随着发酵时间的增加,淀粉含量呈现递减趋势,这与微生物生长代谢中淀粉消耗规律是一致的。在 0~5 d 内,淀粉含量下降最多,可能是发酵前期,微生物较为活跃,且前期酒醅蓬松多孔,使微生物大量消耗淀粉用于生长繁殖,导致淀粉含量下降幅度较大。5~15 d 内,淀粉含量下降变缓,这可能是因为随着发酵的进行,微生物代谢所产生的水与酒醅中未被利用的水逐渐积累沉降,将一些不利于微生物生长的代谢副产物溶于其中,从而降低微生物利用淀粉的能力。15~94 d 内淀粉含量几乎保持不变,是因为发酵后期酒醅中酸度增加,淀粉酶和糖化酶的活力减退,导致微生物对淀粉的消耗速度开始停滞。

还原糖是酒醅中重要的营养物质,微生物生长发酵所需营养均需其提供^[20]。由图 2b 可知,还原糖含量先升高后降低,最后至逐渐平缓的趋势。发酵初期(0~2 d),淀粉酶和糖化酶迅速将淀粉水解为还原糖,产生大量还原糖,此时酵母消耗还原

糖的量小于产生还原糖的量,从而导致还原糖含量增加,第 2 天的还原糖含量最高值为 180.14 g/L。2~15 d 是酵母发酵产酒精阶段,还原糖的产生

少于还原性糖的利用,还原糖含量迅速降低;15~94 d,还原糖含量几乎保持不变。

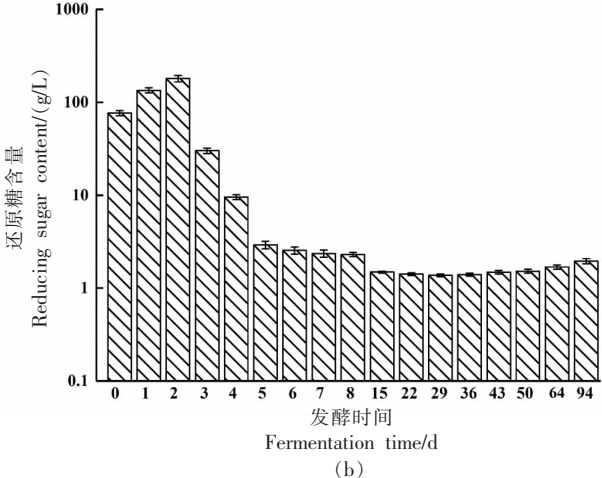
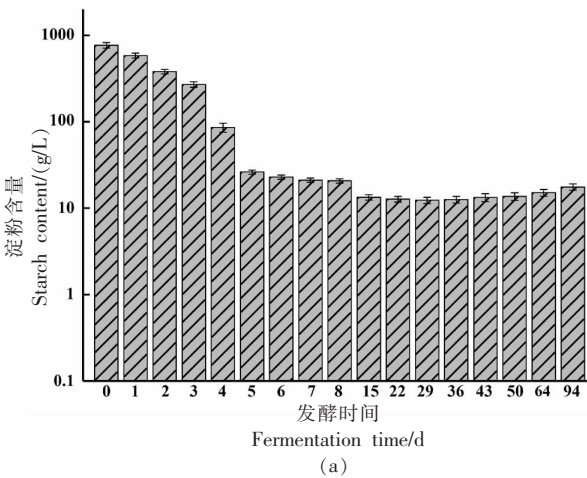


图 2 发酵过程中淀粉、还原糖的变化

Fig.2 The changes in starch and reducing sugar content during fermentation

2.3 大米发酵过程中酒精度的变化

从酒精度曲线图可以看出,酒醅在 0~3 d 内,没有产生酒精度,主要是酵母有氧生长,不产生酒精。在 3~22 d 内,酒精度呈增加趋势,在 22 d 时达到最大值 9.5°,这个阶段是酵母进行无氧发酵产酒精的旺盛期,导致酒精度迅速产生。在 29~64 d 内,酒精度趋于平缓,而在 64~94 d,酒精度迅速降低,可能是发酵后期生成的一些厌氧微生物通过消耗酒精来生长繁殖或酒精通过与酒中的酸类物质发生酯化反应,导致发酵后期酒精度有明显的下降趋势^[21]。

2.4 大米发酵过程中总酚的变化

图 4 为大米发酵过程中总酚随发酵时间的变化情况。发酵可提升白酒的营养价值,同时对原料中的活性物质的释放如总酚有促进作用,并且可提高它们的生物利用率^[22]。在发酵初期,总酚含量为 131.92 mg GAE/L,0~15 d 内总酚含量随发酵时间的增加而迅速增加,可能是在此期间,微生物活动非常活跃,发酵产生的一些物质,如酒精、酶等通过多种途径促进原料中总酚的释放^[23]。15 d 后,总酚含量变化趋势平缓,最终总酚含量最高达 375.63 mg GAE/L。

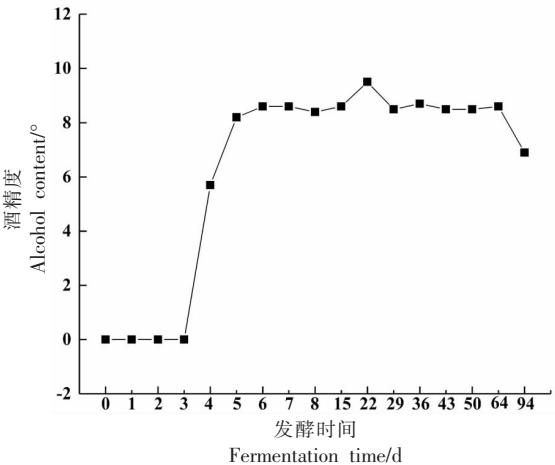


图 3 发酵过程酒精度变化

Fig.3 The changes in alcohol content during fermentation

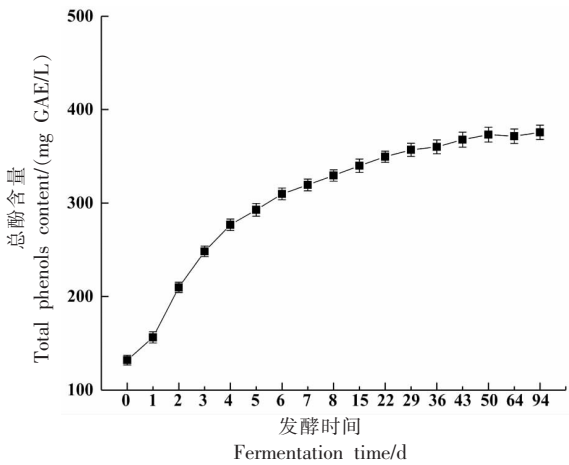


图 4 发酵过程总酚含量的变化

Fig.4 The changes in total phenols content during fermentation

2.5 发酵过程中细菌群落演替规律

对发酵过程中微生物在门和属水平进行分类学分析。如图 5 所示,共检出 33 个门,其中,厚壁菌门(Firmicutes)和变形菌门(Proteobacteria)为主要菌门。发酵 0~2 d 内,变形菌门丰富度增加,厚壁菌门丰富度降低,第 2 天,变形菌门相对丰度达到最大值,为 83.35%;随后,厚壁菌门的相对丰度逐渐增加,第 10 天,最大值 40.15%,此时变形菌门的相对丰度为 59%,这说明在米香型白酒发酵过程中,厚壁菌门和变形菌门为优势菌门。Li 等^[21]通过焦磷酸测序分析汾酒酒醅发酵过程,也发现厚壁菌门和变形菌门是酒醅中主要的细菌种群,同时,在酱香^[24]、芝麻香^[25]和浓香^[26-27]白酒中也同样发现这两个门是发酵过程中的主要优势细菌种群。这些研究表明厚壁菌门和变形菌门是中国

白酒发酵过程中的关键微生物。此发酵过程中,厚壁菌门和变形菌门在不同发酵阶段,主导作用不同,说明米香型白酒的发酵过程是由两种优势菌门接替主导的发酵过程。

此外,如图 6 所示,在属水平上共检出 22 个属,相对丰度高于 1%的优势菌属有 8 类,分别是肠杆菌属(*Enterobacter*)、乳球菌属(*Lactococcus*)、科萨克氏菌属(*Kosakonia*)、泛菌属(*Pantoea*)、假单胞菌属(*Pseudomonas*)、克雷伯菌属(*Klebsiella*)、片球菌属(*Pediococcus*)和阪崎肠杆菌属(*Cronobacter*)。其中肠杆菌属和乳球菌属在发酵前期占主导地位,泛菌属则随发酵时间的增加,丰富度越来越低。在发酵末期,出现较多的假单胞菌属,其为好氧细菌,一般情况属于条件致病菌,建议发酵时间不易过长,否则会导致危害菌属的产生。

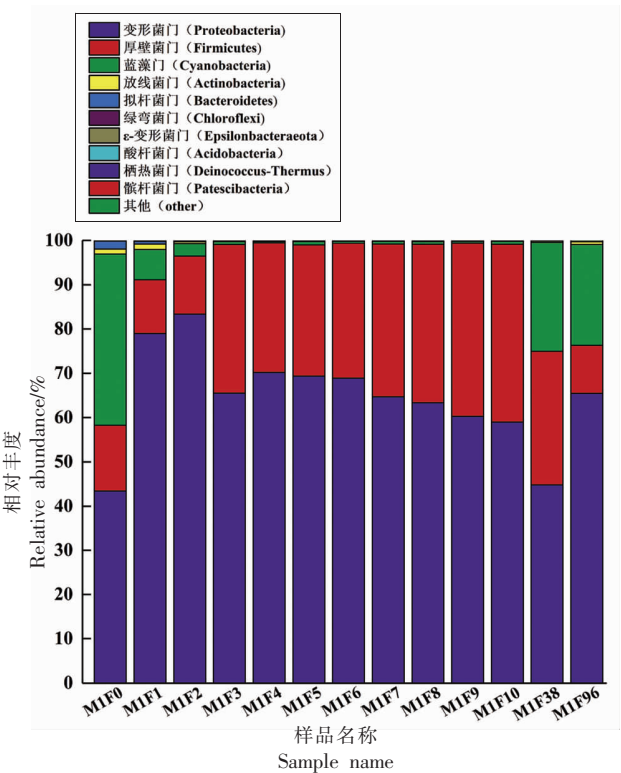


图 5 门水平细菌结构组成分布

Fig.5 Distribution of bacterial structure and composition in phylum

2.6 微生物群落结构多样性分析

样品微生物 α -多样性由 Shannon 表征,指数越大,群落多样性越高;Chaol 指数是用来估算样品微生物 OUT 数目,Chaol 指数越大,说明菌群丰

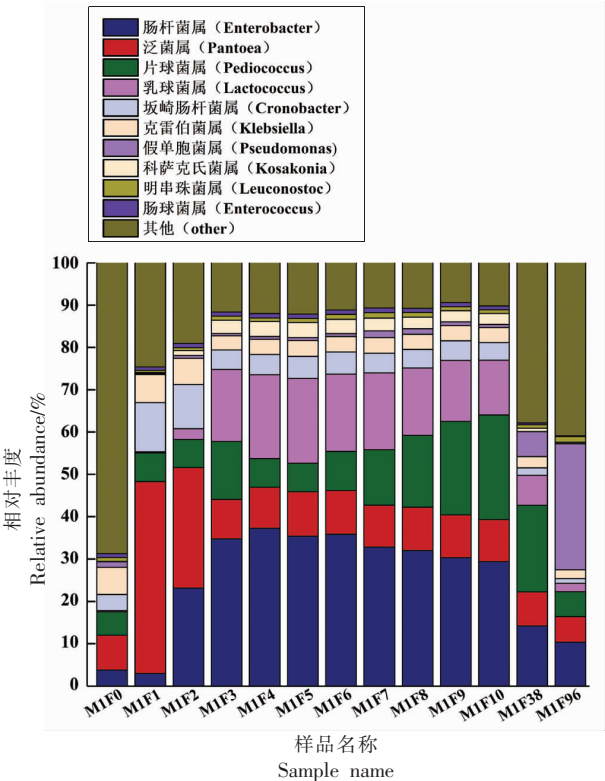


图 6 属水平细菌结构组成分布

Fig.6 Distribution of bacterial structure and composition in genus

度越高^[28]。如图 7 所示,在发酵过程中,多样性指数在前 3 d 内迅速下降,在 4~6 d 又略有回升,然后持续下降直到发酵结束。可能是刚入缸的酒醅中原料种类丰富,如大米、小曲等,这些原料中

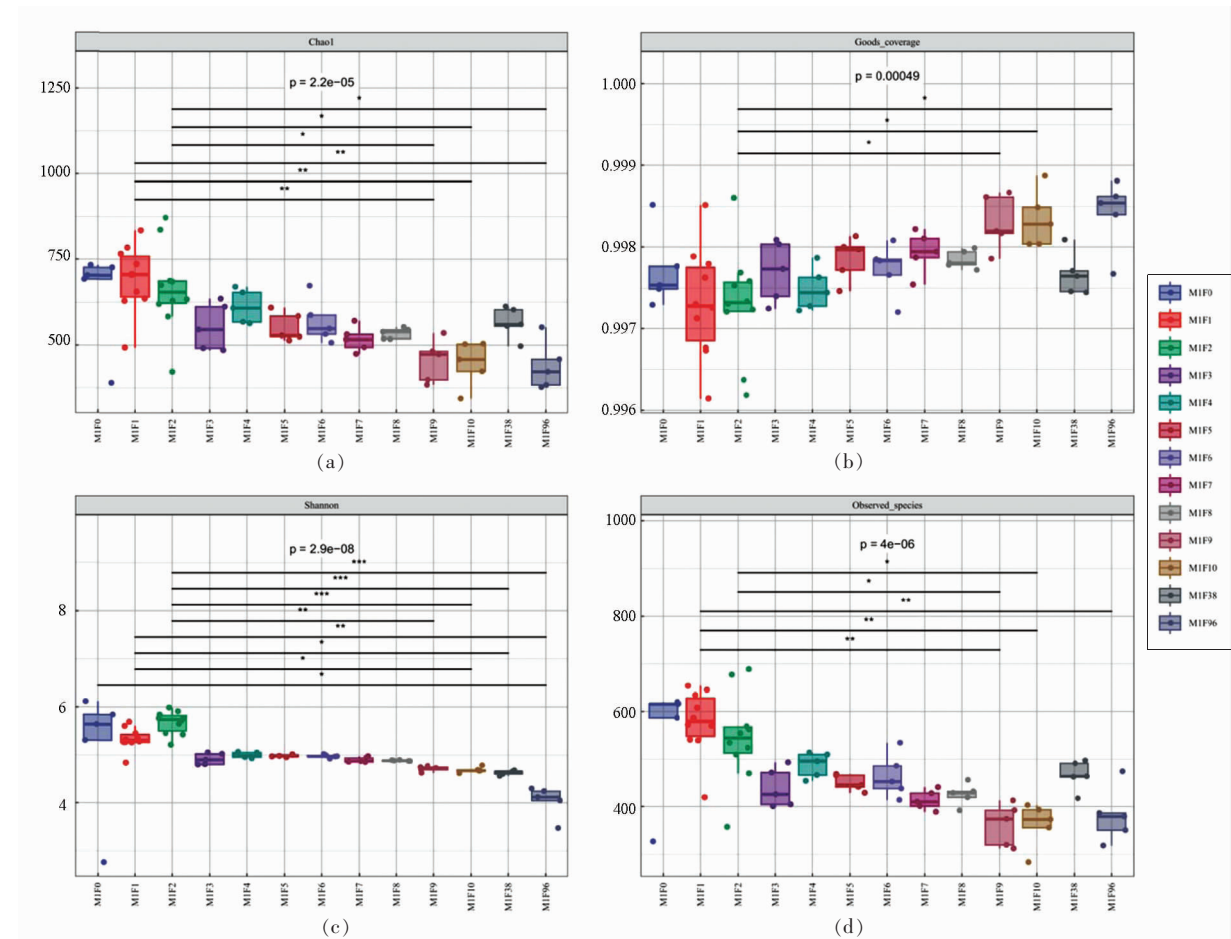


图 7 细菌多样性曲线
Fig.7 Bacterial diversity curve

富含大量的微生物,在 0 d,酒醅中的微生物种类最多。进入发酵启动阶段(0~3 d),多样性指数下降,可能是因为微生物在此阶段发酵繁殖,消耗大量的氧气,导致一些好氧型菌群生长繁殖受到抑制;而在 3~10 d,多样性指数趋于稳定,这是因为发酵进入无氧环境,厌氧细菌开始大量生长繁殖;随着发酵的进行,进入发酵末期 (96 d),Shannon 和 Chaol 指数最小,这是由于发酵后期酒醅环境恶劣,不适宜大多数微生物生长,因此导致微生物多样性明显下降。

稀疏曲线可反映测序量或样本量的饱和情况。从图 8 可知,所有样品随着测序数的增加,曲线越发平缓,说明本次测序覆盖样品中绝大多数细菌和真菌种群信息,测序结果可靠,与向港兴等^[29]报道结果相似。

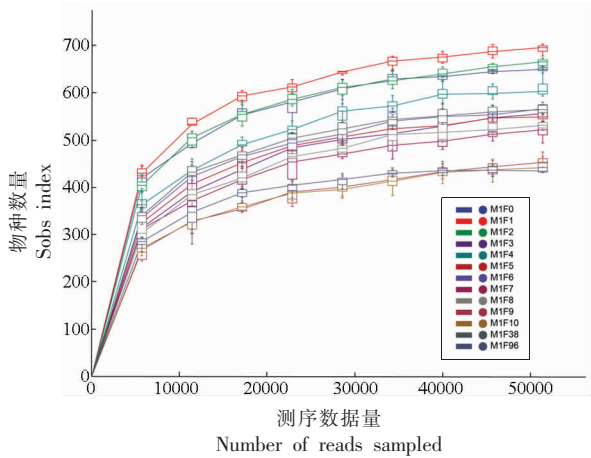


图 8 细菌稀疏性曲线
Fig.8 Bacterial sparsity curve

2.7 PCoA 分析

PCoA 是一种常见的用来研究样本群落组成

的相似性或差异性的方法^[30]。本研究通过 PCoA 对米香型白酒发酵过程中细菌微生物菌群结构的相似性进行评估。如图 9 所示,在 PCoA 图上分为 6 个部分,分别代表 6 个集群:酒醅(发酵 0 d)、酒醅(发酵 1 d)、酒醅(发酵 2 d)、酒醅(发酵 3~10 d)、酒醅(发酵 38 d)与酒醅(发酵 96 d)各集中于一簇,各集群表现出明显的差异。整个发酵过程中,3~10 d 细菌微生物菌群结构没有明显的差异,表明米香型白酒酒醅细菌微生物菌群在这个时间段的优势菌群保持不变。

2.8 理化因子与微生物群落相关性分析

为了进一步解析米香型白酒发酵过程中理化因子与微生物之间的关系,利用 RDA 冗余分析,分析两者间的相关性。本研究经筛选最后选取总酸(Ac)、pH 值、淀粉(St)和还原糖(Rs)4 个理化因子变量用于后续的 RDA 分析。

图 10 显示米香型白酒中发酵过程中 4 种理化因子与微生物中相对丰度前 10 细菌物种之间的关系。图中箭头的长度代表相关性的 大小,中心点和菌群之间的连线与箭头的夹角表示相关性的正负,锐角则呈正相关,反之,钝角表示负相关^[2]。图 10 中两个主成分总解释度 67.82%,主要集中在 RDA1(55.16%)。细菌中的乳球菌属、假单胞菌属和片球菌属与总酸成正相关性,而泛菌属、阪崎肠杆菌属、肠杆菌属和克雷伯菌属与总酸呈负相关。有趣的是,泛菌属、阪崎肠杆菌属、肠杆菌属和克雷伯菌属与 pH 值、淀粉和还原糖都呈正相关。总酸对优势菌属的影响力最大,这与其它文献^[2,31]报道也十分相似,而 pH 值、淀粉和还原糖对优势菌属的影响较为相似。

3 结论

本文解析米香型白酒发酵过程中理化因子、微生物的变化规律。由理化因子变化可知,在发酵前期淀粉被迅速水解成还原糖,而发酵前 2 天还原糖产生大于还原糖利用,在第 2 天还原糖含量达到最大值,pH 值呈现先减小后增加再减小的趋势,总酸则呈逐渐增加的趋势。发酵 0~3 d 内未产生酒精度,发酵 3~15 d 内酒精度呈增加趋势,发酵 22 d 达到最大值,在发酵末期酒精度反而减小。总酚含量则是随着发酵时间的增加而增加,在

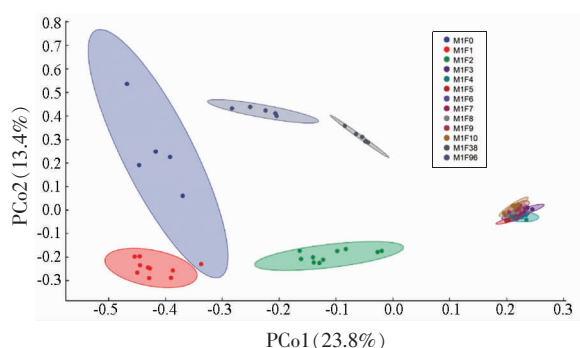


图 9 PCoA 曲线

Fig.9 PCoA curve

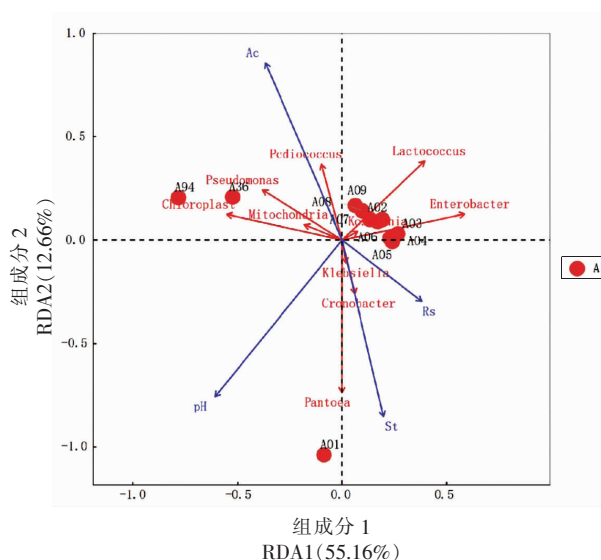


图 10 理化因子与微生物群落 RDA 分析

Fig.10 RDA analysis of physicochemical factors and microbial communities

发酵后期总酚含量也趋于平稳不变。微生物结果表明,发酵过程中变形菌门和厚壁菌门为主要优势菌门,主要优势菌属为肠球菌属、泛菌属、片球菌属和乳球菌属。对整个发酵过程中的菌群结构进行主坐标分析,结果显示:所有样品在 PCoA 图上分为 6 个集群,各集群表现出明显的差异;通过 RDA 分析理化因子和微生物之间的变化,发现总酸对优势菌属的影响最大,而 pH 值、淀粉和还原糖对优势菌属的影响较为相似。

综上所述,在发酵过程中,米香型白酒的理化因子和微生物群落都在动态变化,且理化因子影响微生物群落的演替。本研究对米香型白酒的生产和质量把控有一定的理论指导作用。

参 考 文 献

- [1] 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.
- [2] 胡晓龙, 余苗, 王康丽, 等. 浓香型白酒窖泥微生物群落多样性及理化因素对其影响[J]. 食品研究与开发, 2021, 42(2): 178–185.
- HU X L, YU M, WANG K L, et al. Diversity of microbial community in pit mud of Luzhou flavor Baijiu and effects of physical and chemical factors on it[J]. Food Research and Development, 2021, 42(2): 178–185.
- [3] 余洁瑜, 刘功良, 白卫东, 等. 米香型白酒的研究进展[J]. 中国酿造, 2021, 40(1): 29–32.
- YU J Y, LIU G L, BAI W D, et al. Research progress of rice flavor Baijiu[J]. China Brewing, 2021, 40(1): 29–32.
- [4] TAO Y, LI J B, RUI J P, et al. Prokaryotic communities in pit mud from different – aged cellars used for the production of Chinese strong-flavored liquor[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2014, 80(7): 2254–2260.
- [5] ZHANG M Z, WU X F, MU D D, et al. Profiling the influence of physicochemical parameters on the microbial community and flavor substances of Zaopei[J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2021, 101(15): 6300–6310.
- [6] HU X L, DU H, REN C, et al. Illuminating anaerobic microbial community and cooccurrence patterns across a quality gradient in Chinese liquor fermentation pit muds[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2016, 82(8): 2506–2515.
- [7] WANG H, HUAN Y G, HUANG Y L. Microbiome diversity and evolution in stacking fermentation during different rounds of Jiang-flavoured Baijiu brewing[J]. LWT–Food Science and Technology, 2021, 143(2): 111119.
- [8] 雷振河. 采用高通量测序技术分析清香型白酒酿造微生物[J]. 食品与发酵工业, 2015, 41(9): 164–167.
- LEI Z H. Analysis of Baijiu brewing microorganisms by high-throughput sequencing technology[J]. Food and Fermentation Industries, 2015, 41(9): 164–167.
- [9] 肖琴, 何平, 周瑞平, 等. 不同窖龄及不同位置浓香型白酒窖泥的微生物群落多样性与理化因子的比较分析[J]. 食品科学, 2023, 44(20): 165–174.
- XIAO Q, HE P, ZHOU R P, et al. Comparative analysis of microbial community diversity and physicochemical factors in pit mud of Luzhou flavor Baijiu of different pit age and location[J]. Food Science, 2023, 44(20): 165–174.
- [10] 张明珠, 吴学凤, 穆冬冬, 等. 基于高通量测序的窖泥原核微生物群落结构及其理化因子相关性分析[J]. 食品科学, 2021, 42(18): 111–118.
- ZHANG M Z, WU X F, MU D D, et al. Correlation analysis of pit mud prokaryotic microbial community structure and physical and chemical factors based on high-throughput sequencing[J]. Food Science, 2021, 42(18): 111–118.
- [11] 赵凯, 许鹏举, 谷广烨. 3, 5-二硝基水杨酸比色法测定还原糖含量的研究[J]. 食品科学, 2008, 29(8): 534–536.
- ZHAO K, XU P J, GU G Y. Study on determination of reducing sugar content using 3,5-dinitrosalicylic acid method[J]. Food Science, 2008, 29(8): 534–536.
- [12] 王福荣. 酿酒分析与检测[M]. 北京: 化学工业出版社, 2005: 96–162.
- WANG F R. Brewing analysis and testing[M]. Beijing: Chemical Industry Press, 2005: 96–162.
- [13] HE J M, YIN T P, CHEN Y, et al. Phenolic compounds and antioxidant activities of edible flowers of *Pyrus pashia*[J]. Journal of Functional Food, 2015, 17: 371–379.
- [14] 张会敏, 王艳丽, 孟雅静, 等. 浓香型白酒发酵新老窖泥理化因子和原核微生物群落结构差异分析[J]. 食品科学, 2020, 41(6): 207–214.
- ZHANG H M, WANG Y L, MENG Y J, et al. Analysis on differences of physicochemical factors and prokaryotic microbial community structure of new and old pit mud in Luzhou flavor Baijiu fermentation[J]. Food Science, 2020, 41(6): 207–214.
- [15] 廖昶, 吴生文, 黄小晖, 等. 特香型酒功能窖泥和普通窖泥理化指标对比分析[J]. 酿酒科技, 2010(2): 86–90.
- LIAO C, WU S W, HUANG X H, et al. Comparative analysis of physical and chemical indexes between functional cellar mud and ordinary cellar mud of special aroma liquor[J]. Brewing Technology, 2010(2): 86–90.

- [16] 王鹏, 蒋超, 常强, 等. 绵甜型白酒酿造过程中酒醅理化指标的变化规律[J]. 酿酒科技, 2019(3): 59-64.
WANG P, JIANAG C, CHANG Q, et al. Changes of physicochemical indexes of fermented grains during the production of soft sweet Baijiu[J]. Brewing Technology, 2019(3): 59-64.
- [17] 张霞, 王中凯, 郑佳, 等. 浓香型白酒发酵过程中酒醅理化指标变化规律研究[J]. 酿酒科技, 2021(10): 53-56.
ZHANG X, WANG Z K, ZHENG J, et al. Study on the changes of physical and chemical indexes of fermented grains during the fermentation of Luzhou flavor Baijiu[J]. Brewing Technology, 2021(10): 53-56.
- [18] 章肇敏, 吴生文, 李科发. 特香型白酒酿造过程中物质变化规律研究[J]. 食品工业科技, 2012, 33(9): 108-110.
ZHANG Z M, WU S W, LI K F. Study on the law of substance change during the brewing of special flavor Baijiu[J]. Science and Technology of Food Industry, 2012, 33(9): 108-110.
- [19] 贾丽艳, 郭晋田, 刘帅, 等. 清香型白酒发酵过程中微生物及理化指标的变化规律[J]. 中国食品学报, 2020, 20(8): 162-167.
JIA L Y, GUO J T, LIU S, et al. Changes of microorganisms and physicochemical indexes during the fermentation of light flavor Baijiu[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2020, 20(8): 162-167.
- [20] 李璇, 戚居胜, 韩四海, 等. 浓香型白酒杜康酒醅发酵过程中理化指标变化规律[J]. 食品与发酵工业, 2019, 45(11): 52-57.
LI X, QI J S, HANG S H, et al. Changes of physical and chemical indexes in fermented grains of Du Kang Wine Luzhou flavor Baijiu[J]. Food and fermentation industry, 2019, 45(11): 52-57.
- [21] LI X R, MA E B, YAN L Z, et al. Bacterial and fungal diversity in the traditional Chinese liquor fermentation process[J]. International Journal of Food Microbiology, 2011, 146(1): 31-37.
- [22] 蔡海莺, 盛宇华, 沈灵智, 等. 不同原料的米酒多酚及其抗氧化性能比较[J]. 中国食品学报, 2021, 21(2): 327-333.
CAI H Y, SHENG Y H, SHEN L Z, et al. Comparison of rice wine polyphenols with different raw materials and their antioxidant properties[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2021, 21(2): 327-333.
- [23] YANG Y J, XIA Y J, WANG G Q, et al. Comparison of oenological property volatile profile and sensory characteristic of Chinese rice wine fermented by different starters during brewing[J]. International Journal of Food Properties, 2018, 20(3): S3195-S3211.
- [24] WANG L, WANG Y Y, WANG D Q, et al. Dynamic changes in the bacterial community in Moutai liquor fermentation process characterized by deep sequencing[J]. Journal of the Institute of Brewing, 2015, 121(4): 603-608.
- [25] WANG H Y, ZHANG X J, ZHAO L P, et al. Analysis and comparison of the bacterial community in fermented grains during the fermentation for two different styles of Chinese liquor[J]. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, 2008, 35(6): 603-609.
- [26] WANG X S, 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.
- [27] ZHANG W X, QIAO Z W, SHIGEMATSU T, et al. Analysis of the bacterial community in Zaopei during production of Chinese Luzhou - flavor liquor Journal of the Institute of Brewing[J]. Journal of the Institute of Brewing, 2005, 111(2): 215-222.
- [28] 杨美媛, 孟勤燕, 张艳, 等. 凤香型酒醅中理化指标、功能酶活及微生物变化的研究[J]. 酿酒科技, 2022(4): 30-37.
YANG M Y, MENG Q Y, ZHANG Y, et al. Study on the physicochemical indicators, functional enzyme activity, and microbial changes in Fengxiang fermented grains[J]. Brewing Technology, 2022(4): 30-37.
- [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 physicochemical properties of different levels of strong aroma Daqu[J]. Food Science, 2022, 43(18): 184-191.

- [30] LI P, LIN W F, LIU X, et al. Environmental factors affecting microbiota dynamics during traditional solid-state fermentation of Chinese Daqu starter[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2016, 7: 1–12.
- [31] 徐相辉, 常强, 孙伟, 等. 文王浓香型白酒不同深度新老窖泥理化性质与微生物演替分析[J]. *食品工业科技*, 2022, 43(21): 129–136.
- XU X H, CHANG Q, SUN W, et al. Physico-chemical properties and microbial succession of new and old pit mud in different depths of Wenwang Luzhou flavor Baijiu[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2022, 43(21): 129–136.

The Correlation between Microbial Community Deduction and Physical and Chemical Factors in Xiaoku Fermented Grains of Rice Flavor Baijiu

Li Xin, Rao Wenjun, Hu Shuai, Ouyang Linghua, Zhu Shuilan, Zhou Jinying*

(*Institute of Agricultural Products Processing, Jiangxi Academy of Agricultural Sciences, Nanchang 330200*)

Abstract In order to explore the change rule of microorganism and physical and chemical factors during the fermentation of rice flavor Baijiu, this experiment measured the physical and chemical indexes and microbial community changes on the 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 15, 22, 29, 36, 43, 50, 64 and 94 days during the fermentation process. The results showed that during the fermentation stage, pH showed a trend of decreasing first, then increasing and then decreasing, and at the end of fermentation pH was about 4.1, while total acid showed a gradual increase trend. The starch content is rapidly hydrolyzed and consumed in the early stage of fermentation, and tends to be flat in the later stage of fermentation. However, the reducing sugar content shows an increasing trend within 0–2 days of fermentation, reaching a maximum value of about 180.14 g/L on the second day. Within 2–15 days, it is utilized by microorganisms and its content rapidly decreases. In the early stage of fermentation (0–3 d), no alcohol content was generated, at 22 days of fermentation, the alcohol content reached its maximum value of 9.5°, however, in the later stage of fermentation, the alcohol content decreased. The total phenol content showed an increasing trend with the increase of fermentation time, and the final content was 375.63 mg GAE/L at the end of fermentation. In the fermentation process, Proteobacteria and Firmicutes were the main dominant bacteria, and the main dominant bacteria were *Enterobacter*, *Pantoea*, *Pediococcus* and *Lactococcus*. The results of the principal coordinate analysis showed that all samples were divided into 6 clusters on the PCoA plot, Redundancy analysis (RDA) showed that *Lactococcus*, *Pseudomonas* and *Pediococcus* were positively correlated with total acid composition, *Pantoea*, *Cronobacter*, *Enterococcus* and *Klebsiella* were negatively correlated with total acid composition. However, *Pantoea*, *Cronobacter*, *Enterococcus* and *Klebsiella* were positively correlated with pH, starch (St) and reducing sugars (Rs), and total acids had the greatest impact on the dominant bacteria, pH, starch (St) and reducing sugars (Rs) had similar effects on the dominant bacteria.

Keywords rice flavor Baijiu; physical and chemical factors; microbe; redundancy analysis