

研究报告

高温大曲中大曲慢生芽孢杆菌的分离鉴定与特性分析

刘续^{1,2}, 陆震鸣^{*1,2}, 张晓娟^{1,2}, 柴丽娟^{1,2}, 王松涛³, 张宿义³, 沈才洪³, 龚劲松⁴, 史劲松⁴, 许正宏^{3,5}

1 江南大学 生物工程学院 工业生物技术教育部重点实验室, 江苏 无锡 214122

2 江南大学 粮食发酵与食品生物制造国家工程研究中心, 江苏 无锡 214122

3 国家固态酿造工程技术研究中心, 四川 泸州 646000

4 江南大学 生命科学与健康工程学院, 江苏 无锡 214122

5 四川大学 先进酿造科技创新中心 轻工科学与技术学院, 四川 成都 610065

刘续, 陆震鸣, 张晓娟, 柴丽娟, 王松涛, 张宿义, 沈才洪, 龚劲松, 史劲松, 许正宏. 高温大曲中大曲慢生芽孢杆菌的分离鉴定与特性分析[J]. 微生物学通报, 2025, 52(5): 2189-2202.

LIU Xu, LU Zhenming, ZHANG Xiaojuan, CHAI Lijuan, WANG Songtao, ZHANG Suyi, SHEN Caihong, GONG Jinsong, SHI Jinsong, XU Zhenghong. Isolation and characterization of *Lentibacillus daqui* from high-temperature Daqu[J]. Microbiology China, 2025, 52(5): 2189-2202.

摘要:【背景】随着细菌新物种的陆续报道, 原先被注释为枝芽孢杆菌(*Virgibacillus* sp.)的高温大曲优势 16S rRNA 基因序列被重新归类为大曲慢生芽孢杆菌(*Lentibacillus daqui*), 但对该物种在制曲过程中的发酵特性和代谢功能尚不了解。【目的】研究大曲慢生芽孢杆菌在高温大曲中的分布规律、生长和代谢特性。【方法】采用高通量测序技术分析大曲慢生芽孢杆菌在三类高温大曲中的分布规律; 采用纯培养技术分离大曲慢生芽孢杆菌, 研究其生长的温度、pH、NaCl 浓度等范围; 采用小麦固态发酵试验, 研究大曲慢生芽孢杆菌在不同温度(30、45、60 °C)的产酶和产香特征。【结果】从 48 个高温大曲样品中测序获得 3 条属于大曲慢生芽孢杆菌的 16S rRNA 基因扩增子序列变体(amplicon sequence variant, ASV)序列, 平均相对丰度之和为 21.4%, 均存在于大曲慢生芽孢杆菌 ZS110521^T 的基因组上, 共有 6 个基因拷贝。菌株 ZS110521^T 生长的温度范围 10–55 °C, pH 5.5–10.0, NaCl 浓度范围 0–20%。菌株 ZS110521^T 具有产生糖化酶、纤维素酶与蛋白酶的能力, 在 45 °C 实验组酶活最高。相较于 30 °C 实验组, 45 °C 和 60 °C 发酵试验组的吡嗪类、酚类、酸类、酮类、酯类化合物含量均显著升高, 而醇类化合物含量显著降低($P < 0.05$)。菌株 ZS110521^T 发酵小麦中含量超过 180 ng/g 的优势挥发性化合物有 10 种, 包括川芎嗪、2,3,5-三甲基吡嗪、2,5-二甲基吡嗪、2-乙

资助项目: 国家重点研发计划(2022YFD2101204-01)

This work was supported by the National Key Research and Development Program of China (2022YFD2101204-01).

*Corresponding author. E-mail: zmlu@jiangnan.edu.cn

Received: 2024-09-06; Accepted: 2024-10-02; Published online: 2024-10-30

基-3,5,6-三甲基吡嗪、4-乙基愈创木酚、愈创木酚、苯乙醇、苯甲醛、异戊酸和乙偶姻, 并且其含量均随着培养温度而显著增加。【结论】大曲慢生芽孢杆菌是高温大曲中的优势细菌, 在 45–60 °C 温度下具有良好的产吡嗪类和愈创木酚类物质的能力。研究结果为了解大曲慢生芽孢杆菌的发酵功能与应用潜力提供了依据。

关键词: 高温大曲; 大曲慢生芽孢杆菌; 生长特性; 固态发酵; 挥发性化合物

Isolation and characterization of *Lentibacillus daqui* from high-temperature *Daqu*

LIU Xu^{1,2}, LU Zhenming^{*1,2}, ZHANG Xiaojuan^{1,2}, CHAI Lijuan^{1,2}, WANG Songtao³, ZHANG Suyi³, SHEN Caihong³, GONG Jinsong⁴, SHI Jinsong⁴, XU Zhenghong^{3,5}

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

2 National Engineering Research Center of Cereal Fermentation and Food Biomanufacturing, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu, China

3 National Engineering Research Center of Solid-state Brewing, Luzhou 646000, Sichuan, China

4 School of Life Sciences and Health Engineering, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu, China

5 Innovation Center for Advanced Brewing Science and Technology, College of Biomass Science and Engineering, Sichuan University, Chengdu 610065, China

Abstract: [Background] With the update of the database, the dominant 16S rRNA gene sequence in high-temperature *Daqu* that was originally annotated as *Virgibacillus* sp. has been reclassified as *Lentibacillus daqui*. However, the fermentation characteristics and metabolic functions of this species in the process of *Daqu* production remain unknown. **[Objective]** To study the distribution, growth, and metabolic characteristics of *L. daqui* in high-temperature *Daqu*. **[Methods]** High-throughput sequencing was used to analyze the distribution of *L. daqui* in three types of high-temperature *Daqu*. *L. daqui* was isolated by pure culture and its growth conditions including temperature, pH, and NaCl concentration were studied. A wheat solid-state fermentation experiment was then carried out to study the enzyme production and aroma production characteristics of *L. daqui* at different temperatures (30 °C, 45 °C, and 60 °C). **[Results]** Three distinct amplicon sequence variants (ASVs) from 16S rRNA gene sequences, obtained from 48 high-temperature *Daqu* samples, were annotated as *L. daqui* and constituted 21.4% of the total relative abundance. All the three ASVs were presented in the genome of *L. daqui* ZS110521^T, comprising a total of six gene copies. The strain ZS110521^T could grow at 10–55 °C, pH 5.5–10.0, and the NaCl concentrations of 0–20%. ZS110521^T could produce glucoamylase, cellulase, and protease, with the highest enzyme activity at 45 °C. Compared with the fermentation at 30 °C, the fermentation at 45 °C and 60 °C showed increased content of pyrazines, phenols, acids, ketones, and esters and decreased content of alcohols ($P < 0.05$). Ten dominant volatile compounds with the content exceeding 180 ng/g were detected in ZS110521^T-fermented wheat, including tetramethylpyrazine, 2,3,5-trimethylpyrazine, 2,5-dimethylpyrazine, 2-ethyl-3,5,6-trimethylpyrazine, 4-ethyl-2-methoxyphenol, guaiacol,

phenethyl alcohol, benzaldehyde, isovaleric acid, and acetoin. Moreover, their content significantly increased with the rise in temperature. **[Conclusion]** *L. daqui* is the dominant bacterium in high-temperature *Daqu*, and it demonstrates high production of pyrazines and guaiacols at 45–60 °C. The results provide a basis for understanding the function and application potential of *L. daqui*.

Keywords: high-temperature *Daqu*; *Lentibacillus daqui*; growth characteristics; solid-state fermentation; volatile compounds

大曲主要以小麦、大麦与豌豆等为原料通过天然固态发酵方式制成,是白酒酿造生产过程中重要的糖化剂与发酵剂^[1]。高温大曲的发酵过程中,顶温可以超过 60 °C^[2],主要用于酱香型白酒的生产。高温大曲的发酵工艺复杂,主要包括母曲的添加、高温发酵与 2 次翻曲等操作,大曲平均发酵周期 40 d,随后于曲仓堆积贮存 3–6 个月,用于后续酱香型白酒的生产^[3]。高温大曲天然的发酵方式赋予了酱香型白酒独特的风味特征^[4],对白酒的产量和品质有着重要影响^[5]。在制曲过程中,曲房内不同位置温度、湿度等环境因子的差异,导致形成黑曲、黄曲、白曲不同类型高温大曲^[6]。

慢生芽孢杆菌属(*Lentibacillus*)隶属于厚壁菌门(*Firmicutes*)芽孢杆菌纲(*Bacilli*)芽孢杆菌科(*Bacillaceae*),于 2002 年被首次报道^[7]。目前原核生物命名名录(List of Prokaryotic Names with Standing in Nomenclature, LPSN)共记录了慢生芽孢杆菌属内的 23 个物种。该属细菌为革兰氏阳性,具有好氧和耐盐特性^[8],常见于泡菜^[9–10]、鱼酱^[11–12]和虾酱^[13]等各类发酵食品中。其中大曲慢生芽孢杆菌(*Lentibacillus daqui*) ZS110521^T是 2023 年被首次在高温大曲发现的新物种^[14]。

在前期研究中,枝芽孢杆菌属(*Virgibacillus*)被认为是高温大曲中的优势细菌属,相对丰度为 10.18%–74.53%^[15–17],与多种酶活^[18]与风味物质^[19]关联。然而,近期分析发现高通量测序获得的大曲中枝芽孢杆菌的扩增子序列变体(amplicon sequence variant, ASV)序列与大曲慢生芽孢杆菌 ZS110521^T的 16S rRNA 基因序列

相似性为 100%^[14]。

为进一步确认大曲慢生芽孢杆菌是高温大曲的优势细菌,同时研究大曲慢生芽孢杆菌的生长特性及其在高温大曲发酵过程中的代谢功能,本实验对黑、黄、白 3 种颜色的高温大曲细菌群落进行扩增子测序,分析其优势 ASV 序列是否为大曲慢生芽孢杆菌;其次,通过纯培养技术分离鉴定大曲慢生芽孢杆菌菌株,并通过液体培养研究其生长特性;最后,通过小麦固态发酵试验研究大曲慢生芽孢杆菌在不同温度(30、45、60 °C)产酶与产挥发性化合物的能力,以期明确大曲中大曲慢生芽孢杆菌的生物学特性与酿造功能。

1 材料与方法

1.1 样品

高温大曲样品:从贵州省不同酱酒企业采集高温大曲样本,包括黑曲、黄曲、白曲样品各 16 份。将各大曲样本粉碎后过 40 目筛,装入无菌自封袋中保存于–80 °C,用于高通量测序;另取各样本 200 g 保存在 4 °C,用于微生物的分离鉴定。

实验小麦样品:取自贵州省仁怀市某酱酒企业,粉碎后可直接用于高温大曲生产的小麦。

1.2 培养基、主要试剂和仪器

2216E 琼脂培养基和 2216E 液体培养基,青岛高科技工业园海博生物技术有限公司;胰蛋白胨大豆肉汤(trypticase soy broth, TSB)培养基(g/L):胰蛋白胨 17.0,大豆蛋白胨 3.0,氯化钠 5.0,磷酸氢二钾 2.5,葡萄糖 2.5。在进行最适 NaCl 浓度优化实验中根据不同 NaCl 浓度要

求,调整 TSB 培养基的 NaCl 浓度;小麦固态发酵培养基:将 30 g 经过粉碎的小麦装入 250 mL 三角瓶,121 °C 灭菌 45 min 后无菌条件下加入 15 mL 无菌水。

氯化钠、乙醇、胰蛋白胨、大豆蛋白胨、磷酸氢二钾、磷酸二氢钾、葡萄糖、柠檬酸、柠檬酸钠、碳酸氢钠、碳酸钠、氢氧化钠、2-辛醇、3,5-二硝基水杨酸、福林酚试剂、可溶性淀粉、羟甲基纤维素钠、干酪素和三氯乙酸,国药集团化学试剂上海有限公司;土壤微生物 DNA 提取试剂盒、细菌基因组 DNA 提取试剂盒,南京诺唯赞生物科技股份有限公司。气相色谱-质谱联用仪、毛细色谱柱、固相微萃取(solid-phase microextraction, SPME)自动进样系统,安捷伦科技有限公司;固相微萃取头, NanoDrop 2000 分光光度计, Thermo Fisher Scientific 公司;冷场扫描电子显微镜, HITACHI 公司。

1.3 大曲基因组 DNA 的提取

取 0.5 g 高温大曲粉,按照土壤微生物 DNA 提取试剂盒说明书提取大曲宏基因组。采用 NanoDrop 2000 分光光度计确定 DNA 浓度,以 A_{260}/A_{280} 评价 DNA 纯度,将合格的 DNA 样本冷藏保存于-80 °C 冰箱。

1.4 大曲基因组 16S rRNA 基因测序及生物信息学分析

使用通用引物 338F (5'-ACTCCTACGGG AGGCAGCA-3')与 806R (5'-GGACTACHVGG GTWTCTAAT-3')扩增细菌 16S rRNA 基因的 V3-V4 区^[20],送深圳华大基因科技服务有限公司测序。使用 QIIME 2 去除嵌合体和低质量序列后进行测序数据分析。使用 DADA2 将测序结果划分为不同 ASV 序列。使用 Silva v132 (<https://www.arb-silva.de>)、EzBioCloud、NCBI 等数据库对 ASV 代表序列进行物种类别注释^[21]。

1.5 菌株的筛选与形态学观察

将 10 g 高温大曲粉加入装有 90 mL 无菌生理盐水的 250 mL 三角瓶中,50 °C、200 r/min

条件下振荡 30 min。取 1 mL 菌悬液,利用无菌生理盐水进行 10 倍梯度稀释,取不同稀释倍数的菌悬液 0.1 mL,涂布于 2216E 琼脂培养基上,分别置于 30 °C 和 37 °C 恒温培养箱倒置培养 1-5 d。挑取不同形态的单菌落,并在 2216E 琼脂培养基上划线纯化 3 次以上。单菌落依次用 5% 的戊二醛溶液固定、PBS 缓冲液清洗、乙醇洗脱、喷金与镀膜操作后,使用冷场扫描电子显微镜观察菌体细胞形态。

1.6 菌株的分子生物学鉴定

使用细菌基因组 DNA 提取试剂盒提取分离菌株的 DNA。利用通用引物 27F (5'-AGAGT TTGATCMTGGCTCAG-3')和 1492R (5'-GGTTCCTTGTTACGACTT-3')扩增细菌的 16S rRNA 基因片段^[22],送生工生物工程(上海)股份有限公司进行 16S rRNA 基因序列测定。

1.7 菌株的生长特性

挑取 2216E 琼脂培养基中的单菌落接种于 2216E 液体培养基中,30 °C、200 r/min 培养 24 h,按照 4% 的接种量转接至不同条件的 100 mL TSB 液体培养基中,200 r/min 培养,测定菌株生长 36 h 后发酵液的 600 nm 光密度值(OD_{600})。对培养条件中的 NaCl 浓度、温度、pH 等条件进行优化。

NaCl 浓度的优化:在 TSB 培养基中,调整 NaCl 浓度为 0-25% (浓度间隔 1%),接种后置于 30 °C 培养。

培养温度的优化:在装有 4% NaCl TSB 培养基的摇瓶中接种后,置于 5-60 °C (间隔 5 °C) 的不同恒温培养箱中进行培养。

培养基 pH 的优化:在 4% NaCl TSB 培养基中,使用表 1 所示的生物 pH 缓冲体系^[23]将培养基 pH 值调整在 5.0-11.0 (间隔 0.5),接种后置于 30 °C 培养。

菌株生长曲线与需氧条件的测定:在装有 4% NaCl TSB 培养基的摇瓶中接种后,将摇瓶置于 37 °C 恒温厌氧箱或 37 °C 恒温培养箱中培养 2 d,监测培养过程中发酵液 OD_{600} 的变化。

表 1 pH 缓冲体系

Table 1 pH buffer system

pH	Buffer system
4.0–6.0	0.1 mol/L citric acid/0.1 mol/L sodium citrate
6.0–8.0	0.1 mol/L KH ₂ PO ₄ /0.1 mol/L NaOH
8.0–10.0	0.1 mol/L NaHCO ₃ /0.1 mol/L Na ₂ CO ₃
10.0–12.0	0.2 mol/L K ₂ HPO ₄ /0.1 mol/L NaOH

1.8 菌株的固态发酵试验

将菌株 ZS110521^T 接种于 4% NaCl TSB 液体培养基中, 在 30 °C、200 r/min 条件下培养 24 h, 将发酵液在无菌条件下 4 000 r/min 离心 3 min, 使用相同体积的无菌生理盐水重悬菌体, 然后按 10% 的接种量转接至小麦固态发酵培养基, 静置培养。设置 3 个发酵试验组, 分别为 30 °C 培养 7 d、45 °C 培养 7 d、30 °C 培养 4 d 转移至 60 °C 培养 3 d。对照组不接种大曲慢生芽孢杆菌, 只添加 10% 生理盐水, 其他条件与实验组相同。每组实验 3 个平行。

1.9 菌株的产酶特性分析

采用 3,5-二硝基水杨酸(3,5-dinitrosalicylic acid, DNS)法测定发酵小麦的糖化酶和纤维素酶活性, 采用福林-酚法测定中性蛋白酶活性^[24]。糖化酶活性(U)用 1 g 固态发酵物在 35 °C 每小时糖化淀粉产生葡萄糖的质量(mg)表示。纤维素酶活性(U)用 1 g 固态发酵物在 50 °C 每小时水解纤维素产生的葡萄糖质量(mg)表示。中性蛋白酶活性(U)用 1 g 固态发酵物在 40 °C 水解酪蛋白每分钟产生 1 μg 酪氨酸表示。

1.10 固态发酵挥发性化合物的测定

称取 1 g 固态发酵小麦加入 15 mL 气相色谱样品瓶, 加入 5 mL 蒸馏水和 3 g NaCl, 以及 10 μL 2-辛醇(20 mg/L)作为内标, 用带特氟龙垫片的空心铁盖密封后进行顶空固相微萃取-气相色谱质谱(headspace-solid phase microextraction-gas chromatography-mass spectrometry, HS-SPME-GC-MS)分析。检测条件参照文献[25]。

1.11 固态发酵挥发性化合物分析

大曲慢生芽孢杆菌 ZS110521^T 在不同温度

条件下固态发酵小麦的挥发性化合物分为吡嗪类、酚类、醇类、醛类、酸类、酮类、酯类与其他类化合物进行组间不同类别挥发性化合物对比分析。采用偏最小二乘判别分析(partial least squares-discrimination analysis, PLS-DA)法对比大曲慢生芽孢杆菌 ZS110521^T 在不同温度条件下固态发酵小麦的挥发性化合物组成差异。

1.12 数据分析及绘图

使用 Microsoft Excel 2016 对原始数据进行处理; 使用 SnapGene 4.3.6 进行基因序列比对; 使用 GraphPad Prism 9 进行点线图、柱状图、热图的绘制; 使用 SPSS Statistics 27.0.1 进行方差分析(analysis of variance, ANOVA); 使用 SIMCA 14.0 对挥发性化合物进行偏最小二乘判别分析。

2 结果与分析

2.1 高温大曲细菌群落结构解析

采用高通量测序从 48 个高温大曲样品中测序获得 1 800 条细菌 ASV 序列, 在 Silva 数据库中被注释为 343 个属, 其中相对丰度>1% 的优势属有 10 个, 包括枝芽孢杆菌属(*Virgibacillus*)、克罗彭斯特德菌属(*Kroppenstedtia*)、岩石芽孢杆菌属(*Scopulibacillus*)、大洋芽孢杆菌属(*Oceanobacillus*)、芽孢杆菌属(*Bacillus*)、糖多孢菌属(*Saccharopolyspora*)、葡萄球菌属(*Staphylococcus*)、泛菌属(*Pantoea*)、魏斯氏菌属(*Weissella*)和高温放线菌属(*Thermoactinomyces*)。共有 6 条 ASV 序列在 Silva 数据库中被注释为枝芽孢杆菌, 其中 ASV408、ASV647 和 ASV1340 为优势枝芽孢杆菌 ASV 序列, 在细菌群落中平均相对丰度分别为 14.5%、5.5% 和 1.4%, 其分布情况如图 1 所示。另外 3 条 ASV 序列的平均相对丰度均小于 0.01%。

将 ASV408、ASV647 和 ASV1340 序列分别在其他模式细菌基因数据库进行注释。在 EzBioCloud 数据库中, 注释结果均为马赛慢生芽孢杆菌(*Lentibacillus massiliensis*) Marseille-

P3089, 序列相似度分别为 99.52%、99.28%和 99.28%; 在 NCBI 数据库中, 注释结果均为大曲慢生芽孢杆菌 *ZS110521^T*, 序列相似度均为 100%。

进一步分析发现, ASV408、ASV647 和 ASV1340 序列均位于大曲慢生芽孢杆菌 *ZS110521^T* 基因组的不同位置上, 分别有 4、1 和 1 个拷贝, 为碱基 A 或 G 的差异(图 2)。16S rRNA 基因不同区域存在不同程度的异质性, 因

而利用不同区域的序列进行扩增子测序会造成不同程度的多样性高估^[26]。

综上, 研究确定了大曲慢生芽孢杆菌为高温大曲中优势物种, 在黄曲中平均相对丰度最高 (29.41%), 并且发现 3 条优势 ASV 均存在大曲慢生芽孢杆菌 *ZS110521^T* 基因组上, 共有 6 个拷贝。

2.2 大曲慢生芽孢杆菌的形态学特征

大曲慢生芽孢杆菌 *ZS110521^T* 在 2216E 固体培养基上的菌落形态和扫描电镜结果如图 3

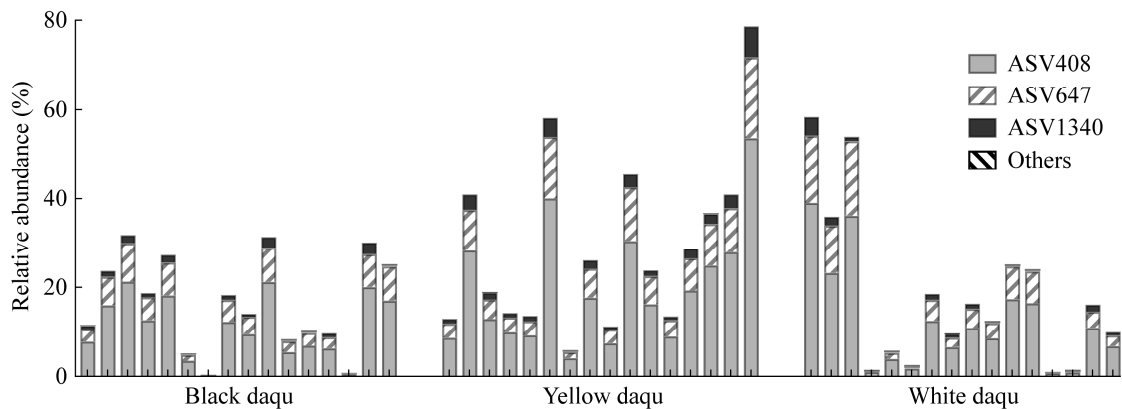


图 1 基于 Silva 数据库注释的高温大曲中枝芽孢杆菌属扩增子序列变体的相对丰度

Figure 1 Relative abundance of amplicon sequence variants for *Virgibacillus* in high-temperature Daqu base on Silva database annotation.

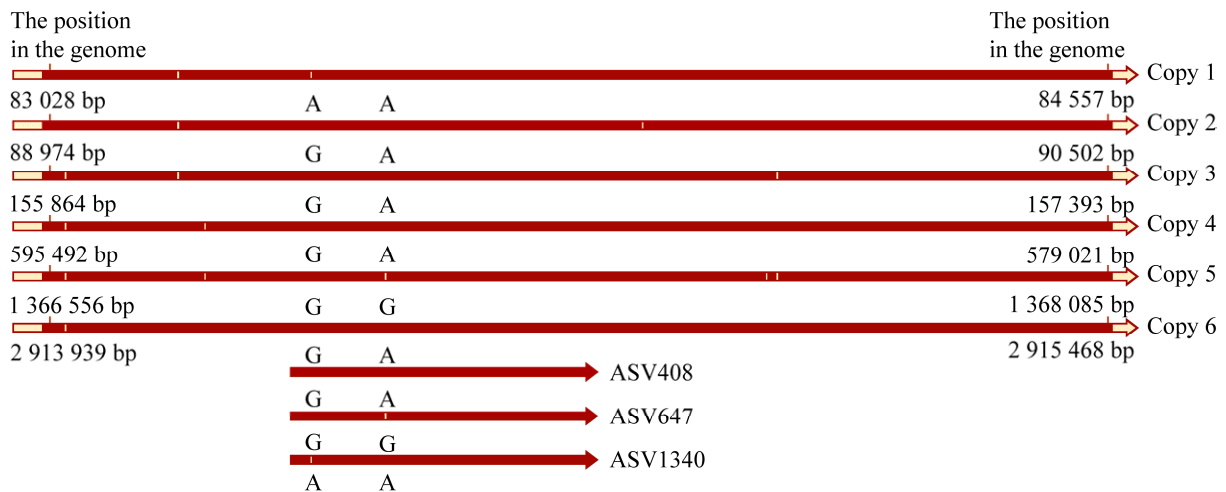


图 2 16S rRNA 基因扩增子序列变体与大曲慢生芽孢杆菌 *ZS110521^T* 全基因组内 16S rRNA 基因比对
Figure 2 Comparison of 16S rRNA gene amplicon sequence variants and 16S rRNA gene within the genome of *Lentibacillus daqui* *ZS110521^T*.



图3 大曲慢生芽孢杆菌 ZS110521^T 的菌落形态(A)和扫描电子显微镜图(B)

Figure 3 Morphological characteristics of *Lentibacillus daqui* ZS110521^T colonies (A) and scanning electron micrograph (B).

所示。在 2216E 固体培养基上 30 °C 培养 5 d 后,菌落直径 1 mm,呈圆形,边缘完整,中间略微凸起,表面光滑,轻微米黄色,不透明(图 3A)。扫描电子显微镜结果显示,细胞呈短杆状,两端光滑,中间粗糙,长 1.5–2.5 μm,宽 0.8–1.0 μm (图 3B)。

2.3 大曲慢生芽孢杆菌的生长特性

在 TSB 培养基中,大曲慢生芽孢杆菌 ZS110521^T 在 5 °C 条件下菌株几乎不生长,10 °C 条件下微弱生长,55 °C 条件下可以生长,最适生长温度为 30–40 °C (图 4A);在 pH 值低于 5.5 或高于 10.5 的条件下停止生长,最适生长 pH 值为 6.5–9.0 (图 4B);NaCl 质量浓度为 0%–20% 的条件下均可生长,最适生长 NaCl 质量浓度为 3%–7% (图 4C)。以 4% 接种量,37 °C 培养 14 h 后进入对数生长期,培养 32 h 时 OD_{600} 达到最大,在无氧的条件下有微弱生长(图 4D)。

2.4 大曲慢生芽孢杆菌固态发酵产酶特性

在小麦固态发酵培养基中进行不同温度单菌发酵试验,其产酶情况如图 5 所示,在 3 种温度条件下大曲慢生芽孢杆菌 ZS110521^T 均具有生产糖化酶、纤维素酶与中性蛋白酶的能

力。在 45 °C 实验组表现出最高的酶活性,平均糖化酶活力、纤维素酶活力与中性蛋白酶活力分别达到 106.8、12.8 和 61.3 U。结果表明大曲慢生芽孢杆菌 ZS110521^T 最适酶活力温度并非对应其最适生长温度,其酶活力在适当高温的条件下有所提升,进而适应高温大曲发酵过程中的温度环境。

2.5 大曲慢生芽孢杆菌固态发酵产挥发性化合物分析

2.5.1 挥发性化合物组成

采用顶空固相微萃取-气相色谱质谱,分别检测 30、45、60 °C 条件下大曲慢生芽孢杆菌 ZS110521^T 固态发酵小麦样品,3 个实验组共计发现 9 种吡嗪类物质、4 种酚类物质、11 种醇类物质、5 种醛类物质、5 种酸类物质、8 种酮类物质、7 种酯类物质、6 种其他物质。在 30、45、60 °C 实验组分别检出 42、55、49 种物质,表明不同温度下产出的物质数量存在差异,温度是控制物质合成的一个因素。如图 6 所示,相较于 30 °C 实验组,45 °C 和 60 °C 实验组的吡嗪类、酸类、酮类、酯类化合物含量均显著升高($P < 0.05$),而醇类化合物含量显著降低($P < 0.05$)。吡嗪类与酚类化合物均在 45 °C 实验组检出最高含量。

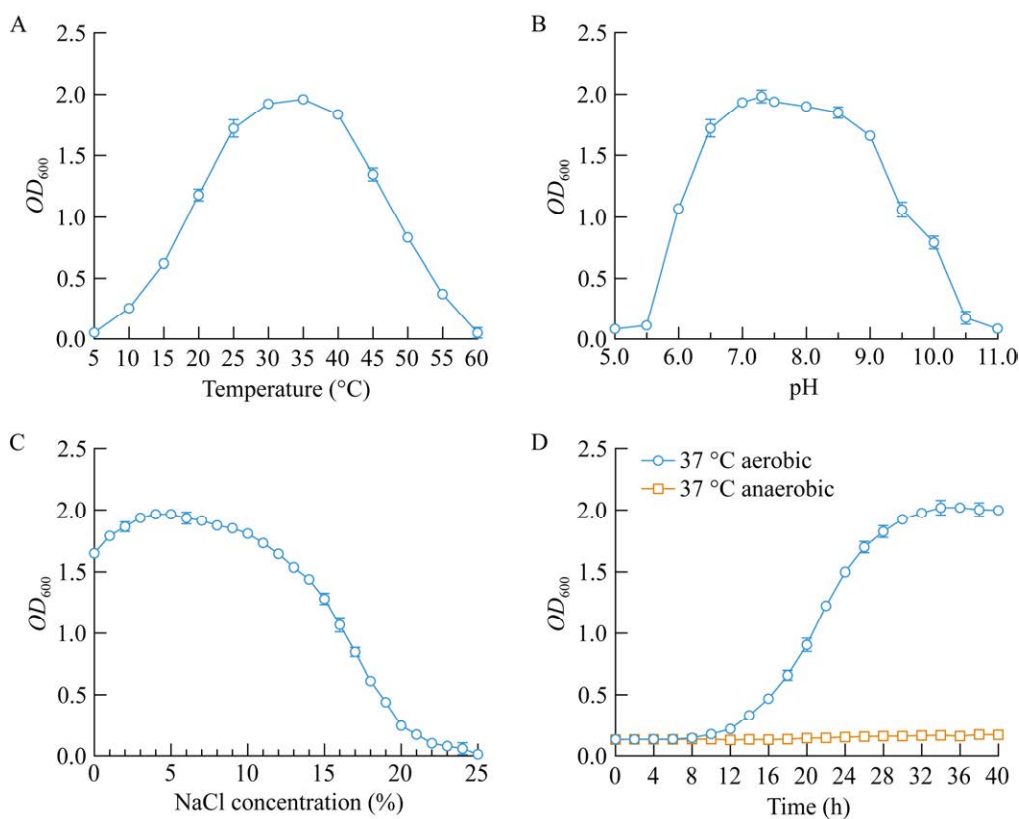


图 4 大曲慢生芽孢杆菌 ZS110521^T 的生长特性 A: 温度; B: pH; C: NaCl 浓度; D: 37 °C 有氧与无氧条件的生长曲线。

Figure 4 The growth characteristics of *Lentibacillus daqui* ZS110521^T. A: Temperature; B: pH; C: NaCl concentration; D: 37 °C aerobic and anaerobic growth curves.

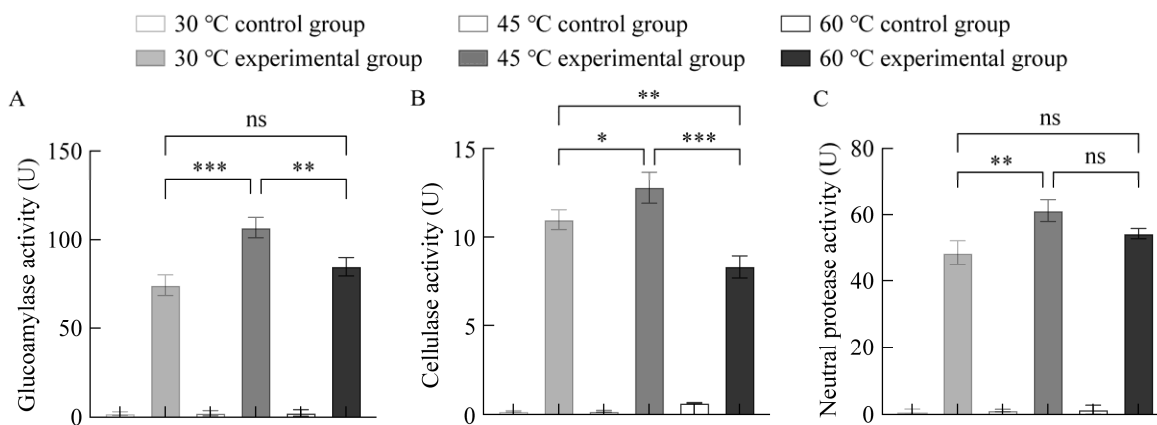


图 5 大曲慢生芽孢杆菌 ZS110521^T 固态发酵的产酶特性 A: 糖化酶; B: 纤维素酶; C: 中性蛋白酶。

Figure 5 Enzyme characteristics of *Lentibacillus daqui* ZS110521^T in solid-state fermentation. A: Glucoamylase; B: Cellulase; C: Neutral proteinase. *: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$; ***: $P < 0.001$; ns: $P > 0.05$.

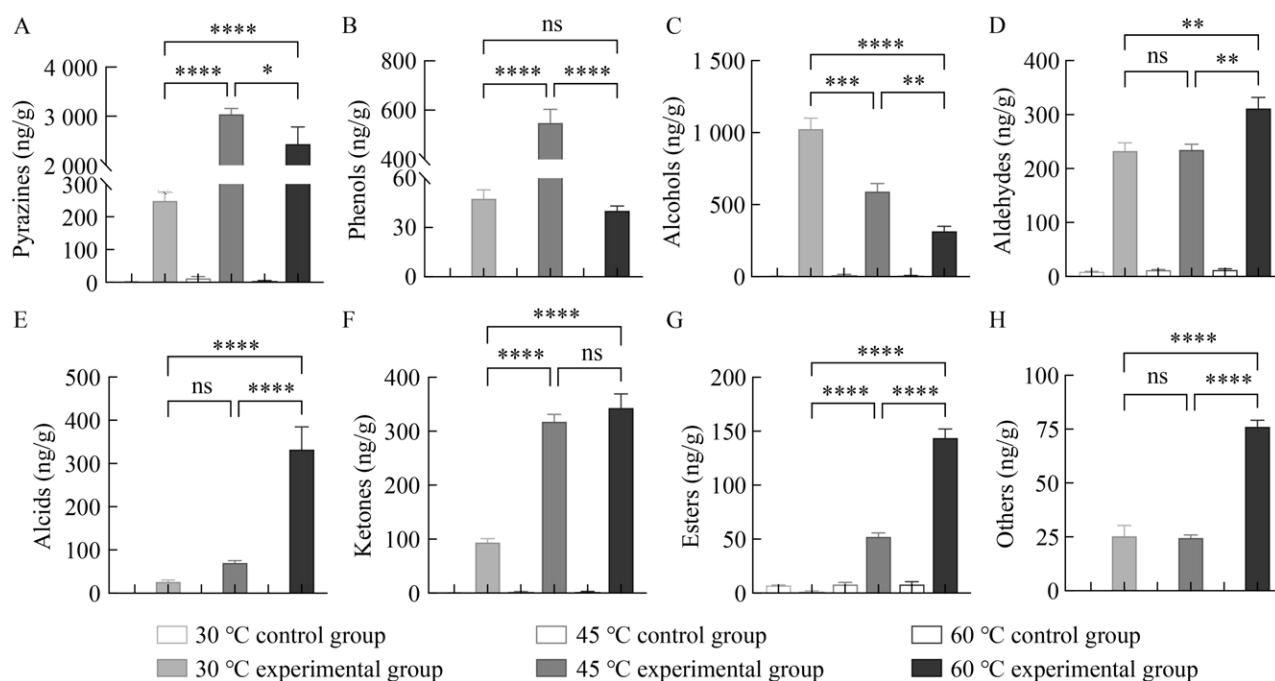


图 6 不同温度时大曲慢生芽孢杆菌 *ZS110521*^T 固态发酵小麦中各类挥发性化合物含量 A: 吡嗪类; B: 酚类; C: 醇类; D: 醛类; E: 酸类; F: 酮类; G: 酯类; H: 其他类。

Figure 6 Content of volatile compounds across various categories in solid-state fermented wheat by *Lentibacillus daqui* *ZS110521*^T at different temperatures. A: Pyrazines; B: Phenols; C: Alcohols; D: Aldehydes; E: Acids; F: Ketones; G: Esters; H: Others. *: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$; ***: $P < 0.001$; ****: $P < 0.0001$; ns: $P > 0.05$.

吡嗪是通过微生物代谢或美拉德反应产生的含氮化合物^[27], 多数具有烘焙香味和坚果香味, 对酱香型白酒的风味具有重要影响^[28]。在 45 °C 与 60 °C 两组产生高含量吡嗪, 分别达到 3 047.59 ng/g 与 2 442.52 ng/g, 而在 30 °C 实验组, 仅检出 249.88 ng/g (图 6A)。酚类物质在白酒中具有抗氧化、血脂调节、血管保护的作用, 45 °C 发酵组的酚类化合物含量为 549.85 ng/g, 显著高于 30 °C 与 60 °C 发酵组(<50.00 ng/g) (图 6B); 醇类物质 3 组检出总量分别为 1 028.19、593.98、318.67 ng/g, 随发酵温度升高表现出降低的趋势(图 6C); 60 °C 实验组醛类物质检出总量最高(312.27 ng/g) (图 6D); 酸类物质随温度升高, 表现出增加趋势, 3 组检出总量分别为 27.40、70.93、332.94 ng/g (图 6E); 酮类物质随温度升高, 表现出增加趋势, 3 组检出总量分别

为 94.62、318.53、343.67 ng/g (图 6F); 酯类物质随发酵温度升高表现出增加趋势, 3 组检出总量分别为 1.35、52.53、144.03 ng/g (图 6G); 说明温度是促进醛类、酸类、酮类、酯类物质生成的重要条件。不同的发酵温度会由不同类型的优势挥发性化合物组成, 不同类型的风味物质相互结合对大曲和中国白酒整体风味的形成具有重要贡献^[29]。

2.5.2 不同温度固态发酵挥发性化合物差异分析

采用偏最小二乘判别分析法对比大曲慢生芽孢杆菌 *ZS110521*^T 在 3 种温度发酵条件下固态发酵小麦的挥发性化合物组成差异, 并根据变量重要性投影(variable importance in projection, VIP)大于 1 的筛选条件, 共获得 15 种特征差异化合物(图 7)。

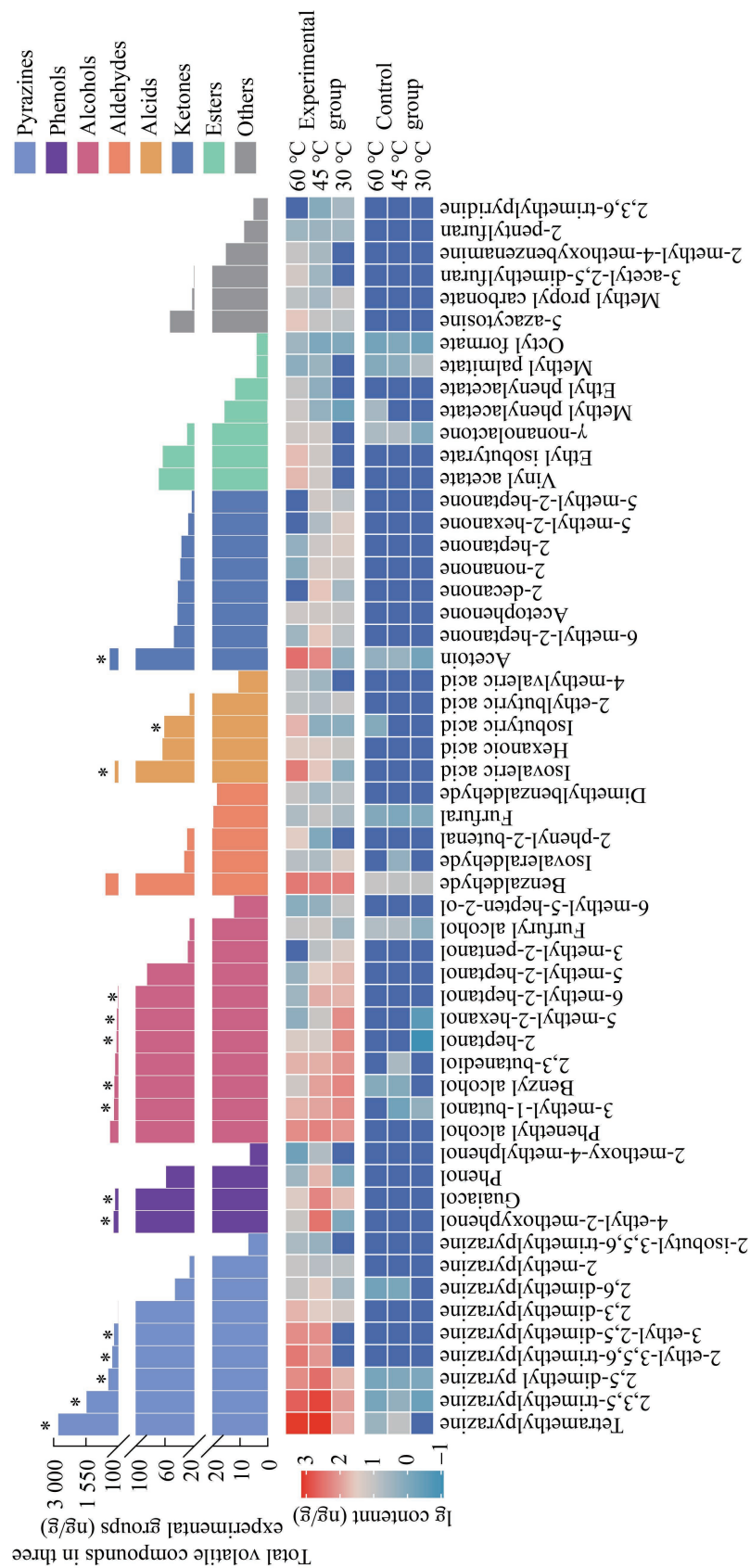


图 7 不同温度时大曲慢生芽孢杆菌 ZS110521^T 固态发酵小麦挥发性化合物组成的差异分析 *：变量重要性投影(VIP)>1 的差异性化合物。
Figure 7 Difference analysis of volatile compounds composition in solid-state fermented wheat by *Lentibacillus daqui* ZS110521^T at different temperatures. *: Differential compounds with variable importance in projection (VIP)>1.

发酵小麦中含量均随着培养温度增加而增加的优势挥发性化合物(含量>180 ng/g)有 10 种,包括川芎嗪、2,3,5-三甲基吡嗪、2,5-二甲基吡嗪、2-乙基-3,5,6-三甲基吡嗪、4-乙基愈创木酚、愈创木酚、苯乙醇、苯甲醛、异戊酸和乙偶姻。其中川芎嗪、2,3,5-三甲基吡嗪、2,5-二甲基吡嗪在 45 °C 检出分别为 30 °C 实验组的 21.51、9.39、6.18 倍,在 60 °C 检出分别为 30 °C 实验组的 18.98、5.07、2.95 倍,2-乙基-3,5,6-三甲基吡嗪、2-乙基-3,6-二甲基吡嗪只在 45 °C 与 60 °C 两组检出;4-乙基愈创木酚与愈创木酚为主要的酚类发酵代谢产物,是高温大曲及酱香型白酒中普遍存在的具有烟熏风味的酚类物质^[30],在 45 °C 实验组检出总量最高,分别达到 306.99 ng/g 与 181.88 ng/g;苯乙醇具有花香气味,对曲香的形成具有较大贡献,在 45 °C 实验组检出总量最高,达到 201.99 ng/g;苯甲醛风味特征为苦杏仁味,3 组分别检出 200.10、215.62、263.60 ng/g;异戊酸会增加白酒的甜感,使酒体更加醇厚^[31],随发酵温度的升高,表现出升高趋势,在 60 °C 实验组检出 232.07 ng/g;乙偶姻是吡嗪化合物生物转化的前体物质^[32],对于吡嗪类物质的生物合成至关重要,随温度的发酵温度的升高,表现出递增趋势,3 组分别检出 1.70、168.80、323.82 ng/g。45 °C 与 60 °C 实验组增加多种酱香型白酒的风味物质,赋予高温大曲与白酒独特的风味特征,表明大曲慢生芽孢杆菌是高温大曲中重要的贡献风味物质的细菌,同时在高温条件下具有更好的风味物质产生效果。

发酵小麦中含量随着培养温度增加而减少的优势挥发性化合物(含量>150 ng/g)有 4 种,包括异戊醇、苜醇、2-庚醇、5-甲基-2-己醇。异戊醇是白酒中高级醇类物质之一,异戊醇含量过高会影响饮用舒适度,45 °C 与 60 °C 实验组检出量分别为 30 °C 实验组的 0.53 倍、0.39 倍;苜醇具有微弱水果香气,浓度过高时会影响白酒的品质,45 °C 与 60 °C 实验组检出量分别为

30 °C 实验组的 0.52 倍、0.09 倍;2-庚醇是酱香型白酒的风味物质,含量过高时会使得白酒带有苦涩味,低含量则会赋予白酒独特的果香气味,同时有助香的作用,45 °C 与 60 °C 实验组检出量分别为 30 °C 实验组的 0.13 倍、0.15 倍;5-甲基-2-己醇含量过高会对白酒口感造成影响,45 °C 与 60 °C 实验组检出量分别为 30 °C 实验组的 0.08 倍、0.01 倍。30 °C 低温小麦发酵条件产生大量高级醇,高含量的高级醇往往伴随着“杂醇油味”,并会给白酒带来不良风味与不佳的饮用体验。高级醇含量随着发酵温度的升高表现出下降趋势,表明温度是控制高级醇过度产生的一个重要方法。

3 讨论

高温大曲是酱香型白酒生产所需的糖化剂与发酵剂^[33],其独特的制曲工艺使得大曲形成种类和结构独特的微生物群落,进一步影响酱香型白酒的独特风味^[34],因此,确定高温大曲优势微生物对解析高温大曲微生物结构与人工群落合成具有重大意义。目前,高通量测序技术由于不需要进行微生物培养并快速获得微生物群落结构信息^[35],被广泛应用于酿造微生物研究领域^[36]。然而,该方法获得的大部分微生物序列物种注释结果主要为属水平,并且数据库的差异导致注释结果在相似物种间存在偏差^[15,20]。

本研究从 48 个不同类型高温大曲的高通量测序结果中获得 3 条优势枝芽孢杆菌 ASV 序列,通过不同数据库注释及与大曲慢生芽孢杆菌 ZS110521^T 基因组比对,发现 3 条 ASV 序列均存在于大曲慢生芽孢杆菌 ZS110521^T 的基因组上,并且存在 6 个拷贝,序列相似性均为 100%,所以确定原先被注释为枝芽孢杆菌的高温大曲优势 16S rRNA 基因序列实际为大曲慢生芽孢杆菌。

在 TSB 液体培养基中,大曲慢生芽孢杆菌 ZS110521^T 的生长温度范围为 10–55 °C,表明

该物种能够适应高温大曲生产过程二次翻曲后的发酵温度^[37]。生长 pH 5.5–10.0, NaCl 质量浓度生长范围为 0%–20%, 说明该物种具有良好的环境抗逆能力。

在小麦固态发酵试验中, 3 个实验组(30、45、60 °C)均检测出糖化酶、纤维素酶和蛋白酶活性, 并且在 45 °C 时酶活最高; 培养温度的升高能够促进大曲慢生芽孢杆菌产生结构不同的挥发性化合物, 其中在 30 °C 时促进醇类物质的产生, 45 °C 促进吡嗪类、酚类和酮类物质的产生, 60 °C 促进吡嗪类、醛类、酸类、酮类和酯类物质的产生, 与文献报道现象一致^[30]。研究发现川芎嗪、2,3,5-三甲基吡嗪、2,5-二甲基吡嗪、2-乙基-3,5,6-三甲基吡嗪、4-乙基愈创木酚、愈创木酚、苯乙醇、苯甲醛、异戊酸、乙偶姻等化合物在高温发酵组中含量显著高于低温组, 说明经历高温发酵的大曲慢生芽孢杆菌对于高温大曲独特风味的形成具有贡献。

4 结论

本研究通过高温大曲细菌群落 16S rRNA 基因 ASV 序列与细菌全基因组序列比对, 确定了大曲慢生芽孢杆菌为高温大曲中优势物种, 并且发现 3 条优势 ASV 均存在大曲慢生芽孢杆菌 ZS110521^T 基因组上, 共有 6 个拷贝。采用纯培养方法研究了大曲慢生芽孢杆菌 ZS110521^T 的生长与代谢特性, 发现其具有良好的高温环境适应能力, 在 45 °C 时具有最佳产酶(糖化酶、纤维素酶和蛋白酶)特性, 不同温度下固态发酵小麦能够产生多种挥发性化合物, 尤其在高温发酵的条件下具有良好的吡嗪类与愈创木酚类物质的合成能力。本研究为认识大曲慢生芽孢杆菌的生长和代谢特性奠定了基础。

REFERENCES

- [1] ZHENG XW, HAN BZ. Baijiu, Chinese liquor: history, classification and manufacture[J]. Journal of Ethnic Foods, 2016, 3(1): 19-25.
- [2] PAN FS, QIU SY, LV YY, LI DN. Exploring the controllability of the Baijiu fermentation process with microbiota orientation[J]. Food Research International, 2023, 173: 113249.
- [3] NIU J, YANG SQ, SHEN Y, CHENG W, LI HH, SUN JY, HUANG MQ, SUN BG. What are the main factors that affect the flavor of sauce-aroma Baijiu[J]. Foods, 2022, 11(21): 3534.
- [4] 沈世明, 梁明锋, 张娇娇, 刘金龙, 雷显仲, 薛新新, 张明松, 颜家庆, 韩兴林. 酱香高温大曲风味轮的初步构建及其香气特征分析[J]. 食品与发酵工业, 2023, 49(1): 73-78.
SHEN SM, LIANG MF, ZHANG JJ, LIU JL, LEI XZ, XUE XX, ZHANG MS, YAN JQ, HAN XL. Preliminary construction of sauce-flavored high temperature Daqu flavor wheel and its aroma characteristic analysis[J]. Food and Fermentation Industries, 2023, 49(1): 73-78 (in Chinese).
- [5] 徐帅哲. 小麦破碎度对酱香大曲品质和微生物多样性影响的研究[D]. 长沙: 中南林业科技大学硕士学位论文, 2022.
XU SZ. Study on the effect of wheat fragmentation on the quality and microbial diversity of Maotai-flavor Daqu[D]. Changsha: Master's Thesis of Central South University of Forestry & Technology, 2022 (in Chinese).
- [6] CAI WC, XUE YA, WANG YR, WANG WP, SHU N, ZHAO HJ, TANG FX, YANG XQ, GUO Z, SHAN CH. The fungal communities and flavor profiles in different types of high-temperature Daqu as revealed by high-throughput sequencing and electronic senses[J]. Frontiers in Microbiology, 2021, 12: 784651.
- [7] YOON JH, KANG KH, PARK YH. *Lentibacillus salicampi* gen. nov., sp. nov., a moderately halophilic bacterium isolated from a salt field in Korea[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2002, 52(Pt 6): 2043-2048.
- [8] SUN PB, GAO JL, MAO XJ, ZHAO XH, SUN JG, LU MZ. *Lentibacillus populi* sp. nov., a moderately halophilic, endophytic bacterium isolated from a poplar tree, and emended description of the genus *Lentibacillus*[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2016, 66(12): 5281-5287.
- [9] OH YJ, LEE HW, LIM SK, KWON MS, LEE J, JANG JY, LEE JH, PARK HW, NAM YD, SEO MJ, ROH SW, CHOI HJ. *Lentibacillus kimchii* sp. nov., an extremely halophilic bacterium isolated from kimchi, a Korean fermented vegetable[J]. Antonie Van Leeuwenhoek, 2016, 109(6): 869-876.
- [10] OH YJ, KIM JY, JO HE, PARK HK, LIM SK, KWON MS, CHOI HJ. *Lentibacillus cibarius* sp. nov., isolated from kimchi, a Korean fermented food[J]. Journal of Microbiology, 2020, 58(5): 387-394.
- [11] TANASUPAWAT S, PAKDEETO A, NAMWONG S, THAWAI C, KUDO T, ITOH T. *Lentibacillus halophilus* sp. nov., from fish sauce in Thailand[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2006, 56(Pt 8): 1859-1863.
- [12] MA XX, SANG X, YAN CY, ZHANG YN, BI JR,

- ZHANG GL, HAO HS, HOU HM. Dynamics of bacterial composition and association with quality formation and biogenic amines accumulation during fish sauce spontaneous fermentation[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2022, 88(13): e0069022.
- [13] BOONCHAROEN A, VISESSANGUAN W, KUNCHAROEN N, YIAMSOMBUT S, SANTIYANONT P, MHUANTONG W, CHAROENSRI S, ROJSITTHISAK P, TANASUPAWAT S. *Lentibacillus lipolyticus* sp. nov., a moderately halophilic bacterium isolated from shrimp paste (*Ka-pi*)[J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2019, 69(11): 3529-3536.
- [14] LIANG Y, LU ZM, SHI W, WU LH, CHAI LJ, ZHANG XJ, ZHANG SY, WANG ST, SHEN CH, XU ZH. *Lentibacillus daqui* sp. nov., isolated from high-temperature *Daqu*, a starter for production of Chinese Jiang-flavour *Baijiu*[J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2023, 73(8): 005962.
- [15] 唐绍培, 朱国军, 王振林, 李婷婷, 王翼, 朱霞, 王晓丹, 张良, 赵金松. 人工和机械化生产酱香型高温大曲过程中微生物群落多样性比较[J]. *中国酿造*, 2024, 43(7): 79-85.
- TANG SP, ZHU GJ, WANG ZL, LI TT, WANG Y, ZHU X, WANG XD, ZHANG L, ZHAO JS. Comparison of microbial community diversity in the manual work and mechanized production process of sauce-flavor high-temperature *Daqu*[J]. *China Brewing*, 2024, 43(7): 79-85 (in Chinese).
- [16] 孙羊羊, 尹亚格, 吴雨菡, 李继齐, 李昂, 杨珍, 杜子平, 王华威, 杜雨平. 基于高通量测序技术分析天津高温大曲微生物菌群多样性[J]. *中国酿造*, 2023, 42(5): 28-34.
- SUN YY, YIN YG, WU YM, LI JQ, LI A, YANG Z, DU ZP, WANG HW, DU LP. Analysis of microbial community diversity of Tianjin high-temperature *Daqu* based on high-throughput sequencing technology[J]. *China Brewing*, 2023, 42(5): 28-34 (in Chinese).
- [17] 杨阳, 禄凌飞, 刘光钱, 张芮, 温福丽, 沈才洪, 董昇, 王小军, 王松涛. 不同发酵顶温大曲中细菌群落结构的差异性分析[J]. *食品与发酵工业*, 2023, 49(13): 70-77.
- YANG Y, LU LF, LIU GQ, ZHANG R, WEN FL, SHEN CH, DONG Y, WANG XJ, WANG ST. Difference analysis of bacterial community structure in *Daqu* with different peak temperatures achieved during fermentation[J]. *Food and Fermentation Industries*, 2023, 49(13): 70-77 (in Chinese).
- [18] DONG WW, YU X, WANG LY, ZOU ML, MA JY, LIU J, FENG YL, ZHAO SM, YANG Q, HU YL, CHEN SX. Unveiling the microbiota of sauce-flavor *Daqu* and its relationships with flavors and color during maturation[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2024, 15: 1345772.
- [19] DU YK, XIN W, XIA Y, ZHU M, QIN JL, PAN ZF, WU RF, LUO GR, WU PS, WU ZY, GOMI K, ZHANG WX. Analysis of fermentation control factors on volatile compounds of primary microorganisms in Jiang-flavor *Daqu*[J]. *Journal of Food Biochemistry*, 2022, 46(10): e14277.
- [20] WU SL, DU H, XU Y. *Daqu* microbiota adaptability to altered temperature determines the formation of characteristic compounds[J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2023, 385: 109995.
- [21] ZHU Q, CHEN LQ, PENG Z, ZHANG QL, HUANG WQ, YANG F, DU GC, ZHANG J, WANG L. Analysis of environmental driving factors on Core Functional Community during *Daqu* fermentation[J]. *Food Research International*, 2022, 157: 111286.
- [22] 肖蓓. 酱香大曲中细菌类群关系研究与功能细菌筛选[D]. 贵阳: 贵州大学硕士学位论文, 2015.
- XIAO B. Study on the relationship between bacterial groups and screening of functional bacteria in Maotai-flavor *Daqu*[D]. Guiyang: Master's Thesis of Guizhou University, 2015 (in Chinese).
- [23] PAN T, HE HR, WANG XC, SHEN YB, ZHAO JW, YAN K, WANG XJ, LIU CX, ZHANG J, XIANG WS. *Bacillus solisilvae* sp. nov., isolated from forest soil[J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2017, 67(11): 4449-4455.
- [24] 印丽, 邱树毅, 曹文涛, 班世栋, 王晓丹. 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 SY, CAO WT, BAN SD, WANG XD. 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).
- [25] SHI W, CHAI LJ, FANG GY, MEI JL, LU ZM, ZHANG XJ, XIAO C, WANG ST, SHEN CH, SHI JS, XU ZH. Spatial heterogeneity of the microbiome and metabolome profiles of high-temperature *Daqu* in the same workshop[J]. *Food Research International*, 2022, 156: 111298.
- [26] SUN DL, JIANG X, WU QL, ZHOU NY. Intragenomic heterogeneity of 16S rRNA genes causes overestimation of prokaryotic diversity[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2013, 79(19): 5962-5969.
- [27] KOEHLER P E, ODELL G V. Factors affecting the formation of pyrazine compounds in sugar-amine reactions[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 18(5): 895-898.
- [28] 朱艳美, 陈亨业, 邓高琼, 付海燕. 高温大曲白酒中吡嗪类化合物的检测、来源、香气和功能活性研究进展[J]. *食品工业科技*, 2023, 44(5): 420-428.
- ZHU YM, CHEN HY, DENG GC, FU HY. Research progress of the detection, source aroma, and functional activity of pyrazine compounds in high temperature *Daqu* baijiu[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2023, 44(5): 420-428 (in Chinese).
- [29] 谢方安. 谈白酒香气成分和作用[J]. *酿酒*, 2006, 33(5): 52-55.
- XIE FA. Discussion on aroma components and functions of liquor[J]. *Liquor Making*, 2006, 33(5): 52-55 (in Chinese).

- [30] 孙佳, 杜海, 徐岩. 高温大曲中大曲岩石芽孢杆菌的筛选及其特性分析[J]. 食品与发酵工业, 2023, 49(17): 75-81.
SUN J, DU H, XU Y. Screening and characterization analysis of *Scopulibacillus daqui* in high-temperature *Daqu*[J]. Food and Fermentation Industries, 2023, 49(17): 75-81 (in Chinese).
- [31] GAO WJ, FAN WL, XU Y. Characterization of the key odorants in light aroma type Chinese liquor by gas chromatography-olfactometry, quantitative measurements, aroma recombination, and omission studies[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2014, 62(25): 5796-5804.
- [32] WU LH, LU ZM, ZHANG XJ, WANG ZM, YU YJ, SHI JS, XU ZH. Metagenomics reveals flavour metabolic network of cereal vinegar microbiota[J]. Food Microbiology, 2017, 62: 23-31.
- [33] 邱声强, 唐维川, 杨官荣, 云岭, 文成兵, 周习, 邓琪, 赵金松. 酱香大曲生产工艺的优化研究[J]. 酿酒科技, 2024(2): 59-64.
QIU SQ, TANG WC, YANG GR, YUN L, WEN CB, ZHOU X, DENG Q, ZHAO JS. Optimization of production technology of Jiangxiang *Daqu*[J]. Liquor-Making Science & Technology, 2024(2): 59-64 (in Chinese).
- [34] 柳习月, 朱琪, 杨帆, 张娟, 张巧玲, 李江华, 王莉. 多组学解析酱香型大曲风味物质的形成[J]. 食品与发酵工业, 2021, 47(22): 35-41.
LIU XY, ZHU Q, YANG F, ZHANG J, ZHANG QL, LI JH, WANG L. Multi-omics reveal the formation of flavor compounds in sauce-flavor *Daqu*[J]. Food and Fermentation Industries, 2021, 47(22): 35-41 (in Chinese).
- [35] WANG YR, CAI WC, WANG WP, SHU N, ZHANG ZD, HOU QC, SHAN CH, GUO Z. Analysis of microbial diversity and functional differences in different types of high-temperature *Daqu*[J]. Food Science & Nutrition, 2020, 9(2): 1003-1016.
- [36] 胡梓晴, 刘晓艳, 白卫东, 赵文红, 魏先领, 钱敏, 费永涛, 余元善. 高通量测序技术在白酒微生物多样性中的研究进展[J]. 中国酿造, 2023, 42(5): 15-21.
HU ZQ, LIU XY, BAI WD, ZHAO WH, WEI XL, QIAN M, FEI YT, YU YS. Research progress of high-throughput sequencing technology in microbial diversity of Baijiu production[J]. China Brewing, 2023, 42(5): 15-21 (in Chinese).
- [37] 李喆, 冯海燕, 吴德光, 何珺珺, 牟海浪, 张春林. 高温大曲发酵过程中理化指标及风味变化规律的研究[J]. 酿酒科技, 2022(10): 40-45.
LI Z, FENG HY, WU DG, HE JJ, MOU HL, ZHANG CL. Changes of physicochemical indexes and flavor of high-temperature *Daqu* during fermentation[J]. Liquor-Making Science & Technology, 2022(10): 40-45 (in Chinese).