

小曲清香型白酒核心菌群优化及发酵特征分析

王涵, 刘晓妹, 孙春虹, 王欢, 阮玉磊, 武晓乐*, 陈叶福, 肖冬光

(天津科技大学生物工程学院, 天津 300457)

摘要: 为探究小曲清香型白酒合成微生物组中 10 种核心微生物的必要性、功能性及小规模生产性能。本研究基于核心微生物分别缺失实验对发酵参数和酒体风味物质的影响确定核心微生物的必要性和功能性, 并以此为依据进一步优化合成微生物组, 最后在 20 kg 发酵体系中考察优化后合成微生物组的生产性能。结果表明: 缺失实验证实 10 种微生物均为核心功能菌群, 任一核心微生物的缺失均会导致发酵理化参数与风味特征偏离原发酵曲。另外, 2,3-丁二醇在合成微生物组酒样中的含量显著高于原曲组, 基于 2,3-丁二醇与核心微生物的负相关性, 通过将合成微生物组中酿酒酵母的接种比例提高至原来的 2 倍, 可使得合成微生物组酒样复现原曲组酒样中 2,3-丁二醇的含量。在 20 kg 规模发酵体系下, 优化合成微生物组酒样中 2,3-丁二醇含量 (5.77 mg L^{-1}) 与原曲组 (6.18 mg L^{-1}) 无显著差异, 两酒样均具备小曲清香型白酒典型的风味特征, 且品评结果无显著差异。研究结果将为合成微生物组在其他清香型白酒中的开发和应用提供理论指导。

关键词: 小曲清香型白酒; 核心微生物; 宏基因组测序; 合成微生物组

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2027.7.0668

Optimization of Core Microbial Communities and Analysis of Fermentation Characteristics in Xiaoqu Baijiu

WANG Han, LIU Xiaomei, SUN Chunhong, WANG Huan, RUAN Yulei, WU Xiaole*, CHEN Yefu, XIAO Dongguang

(College of Biological Engineering, Tianjin University of Science and Technology, Tianjin 300457, China)

Abstract: This study was conducted to explore the necessity, functionality, and small-scale fermentation performance of ten core microbial species in the synthetic microbial community for Xiaoqu light-flavor Baijiu. The necessity and functionality of the core species were determined based on the effects of single-species omission experiments on fermentation parameters and volatile flavor compounds in the final distillate. The community composition was subsequently optimized accordingly. Finally, the production performance of the optimized synthetic community was assessed in a 20 kg fermentation system. The omission experiments confirmed that all ten species were essential functional microbiota, as the absence of any single species led to deviations in physicochemical parameters and flavor profiles from those of the traditional Qu starter. Moreover, the 2,3-butanediol content in the Baijiu sample produced with the synthetic community was significantly higher than that of the original Qu group. Based on the negative correlation between 2,3-butanediol synthesis and the core species, the 2,3-butanediol level in the synthetic community sample was successfully restored to match that of the original Qu group by doubling the inoculation ratio of *Saccharomyces cerevisiae* within the community. In the 20 kg scale fermentation, no significant difference was observed in 2,3-butanediol content between the optimized synthetic community group (5.77 mg L^{-1}) and the original Qu group (6.18 mg L^{-1}). Both Baijiu samples exhibited typical sensory characteristics of Xiaoqu light-flavor Baijiu, and the sensory evaluation scores showed no significant difference between them. These findings will provide theoretical guidance for the development and application of synthetic microbial communities in other light-flavor Baijiu production processes.

Key words: xiaoqu baijiu; core microorganisms; metagenomic sequencing; synthetic microbial community

清香型白酒作为中国白酒的基本香型之一^[1], 因其“清香纯正、醇甜爽净”的风格特点深受消费者的青睐^[2]。但由于清香型白酒小曲普遍存在不同批次土曲的微生物组成极不稳定的隐患^[3], 造成传统和纯种小曲在微生物群落

收稿日期: 2026-04-29; 修回日期: 2026-07-29; 接受日期: 2026-07-30

作者简介: 王涵 (2001-), 男, 硕士, 研究方向: 酿造微生物资源利用与发酵工艺优化, E-mail: 2841237119@qq.com

通讯作者: 武晓乐 (1986-), 男, 博士, 副教授, 研究方向: 酿造微生物与合成生物学, E-mail: wuxiaole@tust.edu.cn

结构上存在显著差异，而微生物群落的差异会直接影响酿造过程中风味物质的生成^[4]。

合成微生物群落（Synthetic microbial community）是指人工将两种或两种以上遗传背景完全解析的微生物在明确培养基质的条件下共同培养而形成的微生物群体，其可通过微生物间的相互作用实现特定的功能^[5]。随着高通量测序、微流控技术和计算生物学的发展^[6]，研究者能够解析复杂微生物群落的物种组成和代谢网络，进而筛选核心功能菌株^[7]，通过人工重构的方式构建具有特定功能的合成微生物群落^[8]。与传统的纯种发酵和复杂的天然微生物群落相比，合成微生物群落具有复杂度低^[9]、可控性强^[10]、稳定性好^[11]、功能可预测等优点，是连接纯种培养与复杂天然群落的桥梁^[12]。合成微生物组已经广泛应用于食醋及果酒领域，Yu 等^[13]通过解析镇江香醋核心风味物质贡献的微生物及其种间互作关系，成功构建了具有稳定产酸与产香功能的合成微生物群落，为传统食醋的可控化、标准化生产提供了技术支撑；Sadineni 等^[14]通过构建 *Saccharomyces cerevisiae* 与 *Metschnikowia pulcherrima*、*Torulaspora delbrueckii* 等非酿酒酵母的合成微生物发酵体系，在保持酒精发酵效率的同时，可显著提高芒果酒中酯类、萜烯类等香气物质含量，增强香气复杂性与感官品质。通过人工设计与调控核心功能菌群，可有效解析并重构风味代谢网络，实现白酒特征风味物质的精准合成与品质稳定^[15]，已有成功案例使用合成微生物组技术复现复杂的传统白酒发酵过程，如 Lu 等^[16]从大曲中分离得到 26 株核心功能微生物，构建了可复现传统大曲核心功能的合成微生物群落，应用到浓香型白酒固态发酵中，结果显示合成微生物组成品酒的风味特征与传统大曲组高度相似，关键风味如四甲基吡嗪含量和棕榈酸甲酯含量均有极大提升，分别是传统大曲组的 4.00 倍和 3.70 倍。

本实验室前期以清香型小曲白酒为模型，通过监测发酵过程，基于丰度与频率、菌群互作和风味贡献三个维度，预测了 10 种核心微生物属（6 种真菌和 4 种细菌）^[17]。以核心微生物属中的优势种进一步构建合成微生物群落，并在实验室规模发酵水平证实合成群落在风味物质组成和理化特性上可重现原发酵体系。

虽然合成微生物群落在实验室规模下能够较好地重现小曲清香型白酒的发酵特征及基酒品质。然而，该研究尚未深入探究 10 种核心微生物各自功能的必要性，也未将该合成群落置于更接近生产实际的规模下进行验证。鉴于此，本研究拟以前期筛选的 10 种核心功能微生物为对象，通过缺失实验明确各核心菌株的必要性，并尝试在更大规模发酵体系中评估优化后合成微生物群落对发酵过程和基酒品质的复现能力，以期为合成微生物群落在小曲清香型白酒工业化生产中的应用提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 材料

10 种核心微生物如下表 1 所示，均为本实验室保存；糯高粱、酒糟、稻壳、原酒曲来源于某小曲清香型白酒厂。

表 1 合成微生物组菌株构成
Table 1 Composition of synthetic microbiome strains

菌株中文名	菌株拉丁名	CFU/g 曲
德根霉	<i>Rhizopus delemar</i>	2.66×10^6
酿酒酵母	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	4.10×10^5
哈萨克斯坦酵母	<i>Kazachstania humilis</i>	1.00×10^3
发酵毕赤酵母	<i>Pichia fermentans</i>	1.00×10^3
东方伊萨酵母	<i>Issatchenkia orientalis</i>	1.00×10^3
异常威克汉姆酵母	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	1.10×10^5
瑞士乳杆菌	<i>Lactobacillus helveticus</i>	9.20×10^5
食蜜魏斯氏菌	<i>Weissella cibaria</i>	1.80×10^6
巴氏醋酸菌	<i>Acetobacter pasteurianus</i>	4.30×10^3
解淀粉芽孢杆菌	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	8.80×10^5

1.2 主要试剂

无水葡萄糖、无水乙酸钠、酵母浸粉、氯化钠、蛋白胨、磷酸氢二钠、氢氧化钠、磷酸二氢钾、五水硫酸铜、酒石酸钾钠（均为分析纯），天津市风船化学试剂科技有限公司；福林酚（分析纯），北京索莱宝科技有限公司。

1.3 主要仪器

LRH-250A 恒温培养箱，上海博迅实业有限公司；LC-E109S 电磁炉，广东顺德忠臣电器有限公司；LDZM-60KCS 高压蒸汽灭菌锅，上海申安医疗器械厂；7890A 气相色谱、1100 液相色谱，北京安捷伦科技有限公司；ISQ 7000GC-MS，赛默飞世尔科技公司；ZHJH-C1115B 超净台，上海智城分析仪器制造有限公司。

1.4 培养基

酵母菌培养基：无水葡萄糖 20.00 g L^{-1} ，蛋白胨 20.00 g L^{-1} ，酵母浸粉 10.00 g L^{-1} ；芽孢杆菌培养基：氯化钠 10.00 g L^{-1} ，蛋白胨 10.00 g L^{-1} ，酵母浸粉 5.00 g L^{-1} ；霉菌液体培养基：马铃薯浸出粉 12.00 g L^{-1} ，无水葡萄糖 20.00 g L^{-1} ；乳酸菌培养基：蛋白胨 10.00 g L^{-1} ，牛肉浸粉 8.00 g L^{-1} ，酵母浸粉 4.00 g L^{-1} ，葡萄糖 20.00 g L^{-1} ，磷酸氢二钾 2.00 g L^{-1} ，柠檬酸氢二铵 2.00 g L^{-1} ，乙酸钠 5.00 g L^{-1} ，硫酸镁 0.20 g L^{-1} ，硫酸锰 0.04 g L^{-1} ，吐温 80 g L^{-1} ；醋酸菌培养基：无水葡萄糖 20.00 g L^{-1} ，酵母膏 20.00 g L^{-1} ；固体培养基则另加 23.00 g L^{-1} 琼脂。以上均为质量浓度。

1.5 固态发酵方法

摇瓶模拟小曲清香型白酒固态发酵原料为糯高粱，参考王瑞鑫等^[18]的方法，工艺流程如下：



图1 小曲清香型白酒实验室发酵流程

Fig.1 Laboratory fermentation process of Xiaoqu baijiu

操作步骤：72 °C 水浸泡高粱 20 h。沥干水分，105 °C 蒸煮 20 min，65 °C 焖粮 5 min 后再次蒸煮 20 min。高粱摊凉至 30 °C 后添加 1 wt.% 酒曲并混匀。底层和顶层覆盖灭菌稻壳后 32 °C 糖化 1 d。添加糖化醪 2 倍质量的灭菌酒糟，用 500 mL 锥形瓶盛装，两层无菌塑料薄膜封口，25 °C 发酵 14 d。发酵结束后，100 g 酒醪蒸馏出 100 mL 酒样，-20 °C 保存。

小曲清香型白酒放大生产发酵步骤与实验室发酵类似，具体步骤可参考吕林杰等^[19]。

1.6 发酵醪理化性质测定方法

发酵醪的水分、还原糖、淀粉、酸度、氨基酸态氮和氨氮的测定方法参考沈怡方^[20]和王斯维等^[21]。

1.7 酒样中风味物质的测定方法

风味物质测定方法参考阮玉磊^[22]，使用安捷伦 7890A 气相色谱仪与 CP-WAX 色谱柱进行分析，载气为高纯氮气，流速 1 mL min^{-1} 。进样口与检测器温度分别为 250、148.8 °C。梯度升温：35 °C 保持 1 min， 3 °C min^{-1} 升至 70 °C 保持 15 min， 3.5 °C min^{-1} 升至 190 °C 保持 22 min。进样体积 $1\text{ }\mu\text{L}$ ，分流比设置为 30:1。高效液相色谱仪型号为 Agilent 1260（外标法），对有机酸（如乙酸和乳酸）、乙醇含量进行测定。色谱条件：Agilent GH0830078H 色谱柱（300 mm×7.8 mm×8 μm ），紫外检测器，柱温 50 °C，前检测器 65 °C，流动相为 $5\text{ mmol L}^{-1}\text{ H}_2\text{SO}_4$ ，流速

0.6 mL min⁻¹, 波长 210 nm, 进样量 20 μ L。

1.8 宏基因组测序发酵酒醅微生物组成方法

样品前处理: 取发酵终点酒醅 60 g 于离心管中, 加入 120 mL 无菌 PBS 缓冲溶液, 震荡 10 min, 八层纱布过滤, 滤液 8 000 r min⁻¹ 离心 10 min 后收集沉淀, 将沉淀保存于 -80 $^{\circ}$ C 冰箱中。分析流程: 采用 Illumina NovaSeq 平台对样本宏基因组 DNA 进行 PE150 测序; 原始数据经 fastp 质控去杂, 使用 Kraken2 完成物种注释; 基于物种丰度进行 α 多样性、 β 多样性 (PCoA/UPGMA) 分析。

1.9 数据处理和统计分析

本研究采用 SPSS 27.0.1 软件进行数据统计学分析及显著性差异检验; 利用 Origin 2024 软件进行数据可视化; 基于 R 4.5.1 与 R Studio 平台开展数据分析, 借助 dplyr 程序包实现数据预处理与规范化处理; 所有试验均设置 3 个生物学重复, 2.1 及 2.2 采用单因素方差分析, 2.3 采用独立样本 t 检验进行组间差异比较, 均以 $P < 0.05$ 作为差异具有统计学显著性的判定标准。

2 结果与分析

2.1 小曲清香型白酒核心微生物的必要性和功能性考察

本实验以企业生产用曲 (原曲) 和小曲清香型合成微生物组 (合成微生物组) 为对照组, 在后者的基础上, 采用单菌种缺失法构建 10 组缺失型合成微生物组作为实验组 (Δ 德尔根霉组、 Δ 酿酒酵母组、 Δ 哈萨克斯坦酵母组、 Δ 发酵毕赤酵母组、 Δ 东方伊萨酵母组、 Δ 异常威克汉姆酵母组、 Δ 瑞士乳杆菌组、 Δ 食蜜魏斯氏菌组、 Δ 巴氏醋酸菌组、 Δ 解淀粉芽孢杆菌组), 考察各核心微生物的必要性和功能性。

图中不同字母代表具备显著性差异 ($P < 0.05$)。所有组的还原糖含量均处于 0.10 wt.%~0.90 wt.% 之间 (图 2a), Δ 东方伊萨酵母组还原糖含量最高 (0.87 wt.%), Δ 德尔根霉组还原糖含量最低 (0.18 wt.%)。除了 Δ 德尔根霉组的淀粉含量达到了 18.80 wt.% 之外, 其余各组均保持在 6.70 wt.%~8.80 wt.% (图 2f)。在白酒酿造过程中, 霉菌分泌的淀粉酶和糖化酶能够将淀粉分解为还原糖^[23], 因此, 缺乏霉菌会导致发酵体系中的淀粉无法被有效水解, 还原糖含量最低。葡萄糖和果糖易被东方伊萨酵母利用^[24], 由于缺失该菌株, Δ 东方伊萨酵母组表现为还原糖含量最高。

各组酒醅的含水量均维持在 60.00 wt.%~70.00 wt.% 之间 (图 2b), Δ 巴氏醋酸菌组的水分最高 (69.50 wt.%), Δ 德尔根霉组的水分最低 (61.10 wt.%)。霉菌分泌的淀粉酶和糖化酶在水解淀粉时会释放出结合水^[25], 缺失霉菌后, 就会导致酒醅的水分下降。各组酒醅酸度维持在 0.80~0.90 (图 2c), Δ 发酵毕赤酵母组和 Δ 巴氏醋酸菌组的酸度最高 (0.90), Δ 酿酒酵母组和 Δ 东方伊萨酵母组的酸度最低 (0.81)。

各组出池醅的氨氮含量 (质量浓度) 维持在 0.20~0.60 mg g⁻¹ (图 2d), 其中, Δ 食蜜魏斯氏菌组的氨氮含量最高 (0.58 mg g⁻¹), 而 Δ 德尔根霉组的氨氮含量最低 (0.22 mg g⁻¹)。食蜜魏斯氏菌是酒醅中具备高效二肽、三肽水解活性的核心菌株^[26], 其缺失不仅削弱了蛋白质的降解效率, 也打乱了体系中氮源供给与消耗的平衡, 导致酒醅在发酵结束时残留的氨氮含量在各缺失组中最高。

各组的氨基酸态氮含量 (质量浓度) 保持在 1.80~3.00 mg g⁻¹ 之间 (图 2e), Δ 发酵毕赤酵母组和 Δ 酿酒酵母组的氨基酸态氮含量最高 (2.80 mg g⁻¹), Δ 德尔根霉组最低 (1.80 mg g⁻¹)。酒醅中氨基酸态氮含量受“生成-消耗”双重机制的调控, 德尔根霉是体系中主要的蛋白水解菌, 其分泌的酸性蛋白酶负责将大分子蛋白分解为小分子氨基酸^[27], 缺失该菌株后, 蛋白质降解受阻, 导致该组酒醅中氨基酸态氮含量最低。相反, 酿酒酵母^[28]和发酵毕赤酵母^[29]是体系中主要的氮源消耗者, 缺失其中任一菌株均会削弱氮源利用, 使得水解产生的小分子氮源无法被有效消耗, 最终造成酒醅中氨基酸态氮剩余含量最高。

为系统比较各组样品在风味物质组成上的整体差异与占比特征, 按醇类、醛类、酸类、酯类四大类别对全部风味物质进行归类分析, 如下图 3 所示。

醇类物质在各组的四大物质中的占比介于 11.00%~26.30% 之间, 占比最低的是 Δ 德尔根霉组, 仅为 11.00%, 占比最高的是 Δ 食蜜魏斯氏菌组, 达到了 26.30%; 醛类物质是四大物质中占比最低的一类物质, 介于 0.20%~3.20%,

其中占比最低的是 Δ 德尔根霉组, 仅为 0.20%, 占比最高的是 Δ 食窦魏斯氏菌组, 达到了 3.20%; 酸类物质是四大物质中占比最大的一类物质, 除了 Δ 德尔根霉组占比超过 75.00% 之外, 其余各组的酸类物质均保持在 50.00%~62.00%; 酯类物质在四大物质中的占比介于 9.90%~27.00%, 占比最低的是 Δ 德尔根霉组, 仅为 9.90%, 占比最大的是 Δ 解淀粉芽孢杆菌组, 达到了 27.00%。

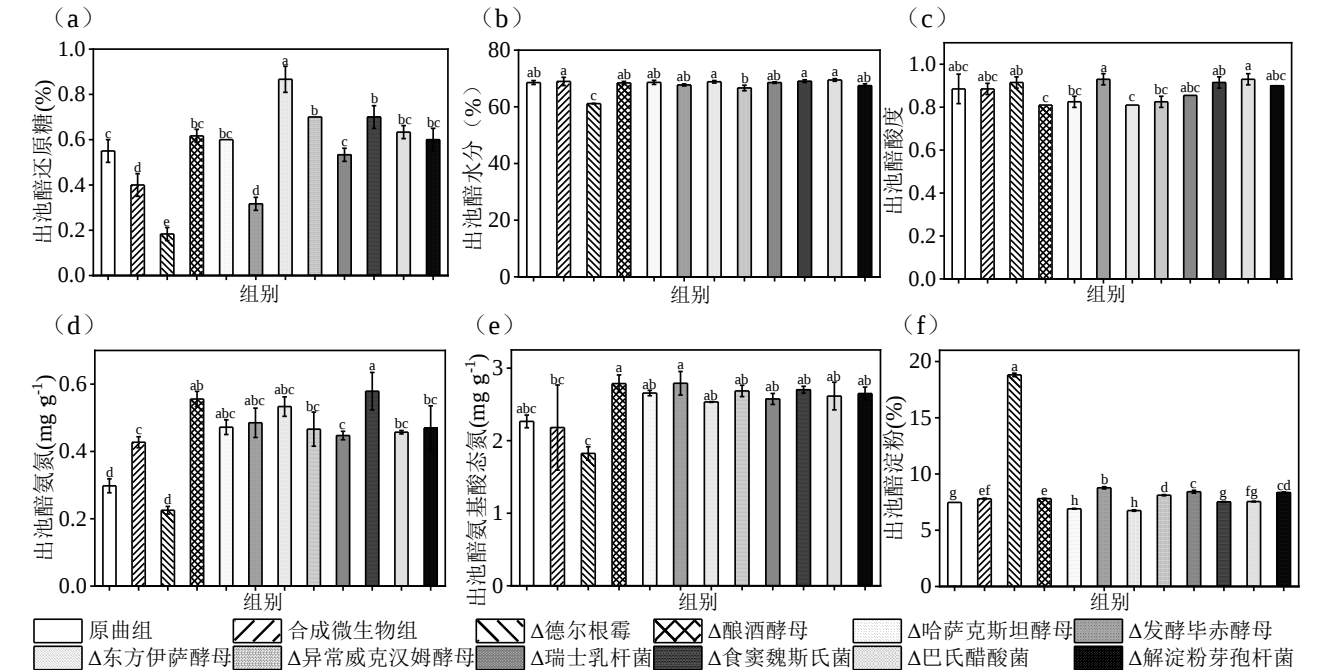


图 2 不同组发酵过程理化指标

Fig.2 Physicochemical indicators of fermentation processes in different groups

注: (a) 还原糖含量; (b) 水分含量; (c) 酸度; (d) 氨氮含量; (e) 氨基酸态氮含量; (f) 淀粉含量。不同小写字母表示具备显著性差异 ($P < 0.05$)。下图同。

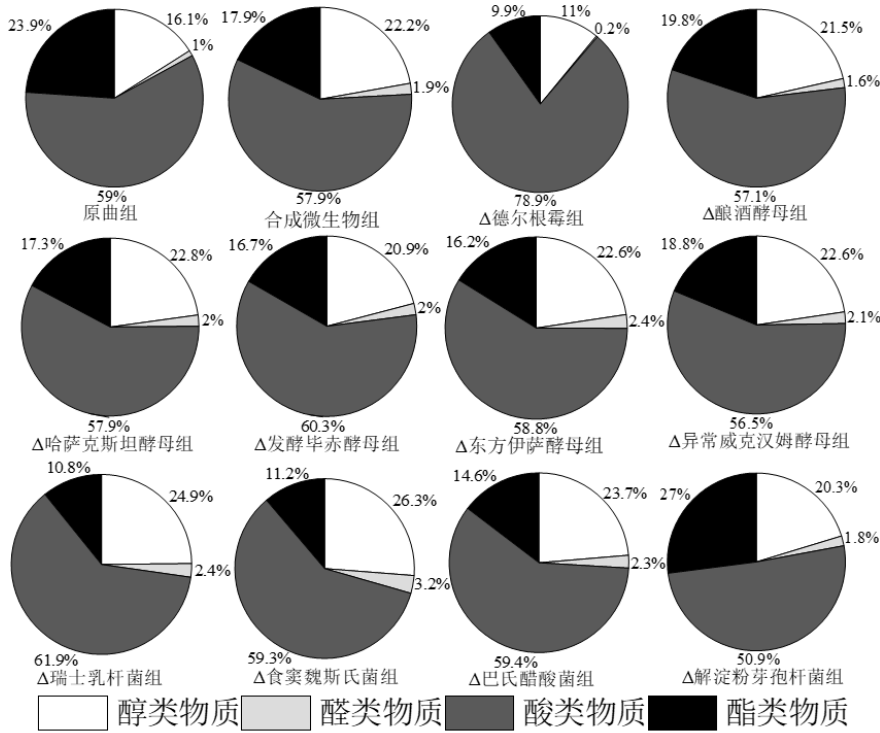


图 3 不同组酒样风味物质占比

Fig.3 Percentage of flavor compounds in different groups of baijiu samples

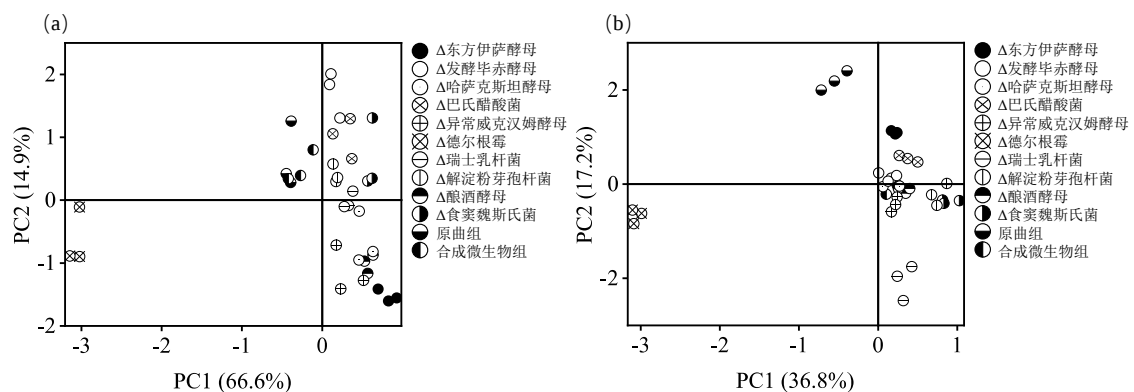


图 4 不同组别的理化指标及风味物质主成分分析

Fig.4 Principal component analysis of physicochemical indicators and flavor compounds across different groups

注：（a）不同组别的理化性质分析；（b）不同组别白酒中的风味物质含量分析。

基于不同组别出池醪的理化指标及蒸馏酒样中的风味物质含量进行主成分分析^[30]（PCA），尝试量化不同组出池醪发酵性质的相似程度、风味轮廓的差异与聚类规律，结果如图 4 所示。

图 4a 中 PC1 和 PC2 的累计方差贡献率为 66.60%和 14.90%，合计达 81.50%（>80%），表明前两个主成分能够较好地解释原始数据中的大部分信息，可以有效反映不同发酵组理化性质的区分情况。合成微生物组与原曲组的分布最为接近，表明完整的核心微生物组合能够较好复现原曲的理化代谢特征，但是当德尔根霉缺失时，其理化性质与原曲组的理化性质出现了最为显著的差异，与 Δ 德尔根霉组相比，虽然其余 9 种单菌种缺失组与原曲组的理化性质未出现极其显著的差异，但 9 组单菌种缺失组均未与原曲组和合成微生物组形成有效聚类，因此认为其余 9 株菌的缺失同样会造成发酵过程中理化性质与原曲的差异，证实 10 株微生物在理化代谢过程中均具有不可替代性。

酒样风味物质分析显示， Δ 德尔根霉组与其余组别完全分离，德尔根霉的缺失对酒样整体风味轮廓产生了根本性影响（图 4b）； Δ 瑞士乳杆菌组与大多数组别形成了显著分离，表明瑞士乳杆菌的缺失对酒样整体风味轮廓产生了巨大影响；剩余组别与合成微生物组形成了一定的聚类效果，表明菌株的缺失虽未明显改变酒样的整体风味特征，但在局部风味维度上存在差异；而原曲组与合成微生物组呈现出明显的空间分离现象，未形成有效聚类，表明本研究构建的合成微生物组仍无法完全复现原曲组的风味特征，二者在风味物质组成上存在差异。

2.2 差异风味物质分析及合成微生物组优化

为了进一步探究原曲组和合成微生物组酒样中风味物质的差异，利用 R 对两组酒样中的风味物质进行精准筛选。采用相对标准偏差（RSD）<20%、组内变异系数（CV）<10%、差异倍数（FC）>1.3 或 <0.7、t 检验 $P<0.05$ 的标准进行筛选^[31]，结果显示酒样中检测到的 18 种风味物质中仅有 2,3-丁二醇在两组中出现显著性差异（表 2）。

表 2 差异风味物质

Table 2 Differential flavor compounds

差异风味物质	原曲组含量/(mg L ⁻¹)	发酵组含量/(mg L ⁻¹)	FC	组名	P 值
2,3-丁二醇	44.89 ± 0.81 ^a	84.93 ± 1.08 ^b	0.52	合成微生物组	8.00 × 10 ⁻⁴
		69.62 ± 0.86 ^b	0.64	Δ 东方伊萨酵母	1.00 × 10 ⁻³
		80.48 ± 2.64 ^b	0.55	Δ 发酵毕赤酵母	0.02
		81.39 ± 1.45 ^b	0.55	Δ 解淀粉芽孢杆菌	3.00 × 10 ⁻³
		87.22 ± 2.69 ^b	0.51	Δ 瑞士乳杆菌	0.01
		88.06 ± 0.86 ^b	0.50	Δ 食蜜魏斯氏菌	3.00 × 10 ⁻⁴
		91.53 ± 0.48 ^b	0.49	Δ 酿酒酵母	7.00 × 10 ⁻⁴

注：a 表示原曲组，b 表示该组与原曲组相比差异显著（ $P<0.05$ ）。字母不用于发酵组间的比较。

基于 10 种单缺失核心微生物组和原曲组酒样中 2,3-丁二醇含量的差异性，进行系统比对与关联分析，尝试探寻到可对酒样中 2,3-丁二醇含量造成显著影响的微生物（表 2）。结果表明 Δ 东方伊萨酵母组、 Δ 发酵毕赤酵母组、

Δ 解淀粉芽孢杆菌组、 Δ 瑞士乳杆菌组、 Δ 食蜜魏斯氏菌组和 Δ 酿酒酵母组酒样中的 2,3-丁二醇含量(质量浓度)相比于原曲组分别升高了 55.10%、79.30%、81.30%、94.30%、96.20%和 103.90%。其中,酿酒酵母缺失后,该组酒样中的 2,3-丁二醇含量出现极大幅度上升,因此推断酿酒酵母与 2,3-丁二醇含量呈负相关关系。已有研究表明 2,3-丁二醇是小曲清香型白酒的主要风味化合物之一^[32],但其含量升高会增加酒体厚重感和黏度,导致改变整体香气风格^[33]。由于菌种的过量添加可能破坏原有微生物群落结构的平衡^[34],于是在原合成微生物组(表 1)的基础上,通过增加一倍的酿酒酵母(由 4.10×10^5 CFU/g 曲增加至 8.20×10^5 CFU/g 曲),构建优化合成微生物组作为实验组(优化),以原曲组、原合成微生物组作为对照组,通过实验室模拟小曲清香型白酒固态发酵,考察优化合成微生物组对于酒样中 2,3-丁二醇的复现效果(图 5)。

各组酒样中的 2,3-丁二醇含量(质量浓度)保持在 $40.00 \sim 62.00 \text{ mg L}^{-1}$ 。含量最低的是原曲组,仅有 41.73 mg L^{-1} ,显著低于原合成微生物组(61.24 mg L^{-1})($P < 0.05$);优化组为 43.30 mg L^{-1} ,与原曲组无显著性差异($P > 0.05$)。结果表明在原合成微生物组的基础上,通过强化添加酿酒酵母能有效降低酒样中 2,3-丁二醇含量,使其更趋近于原曲组的水平,从而在一定程度上实现对原曲组风味特征的复现。

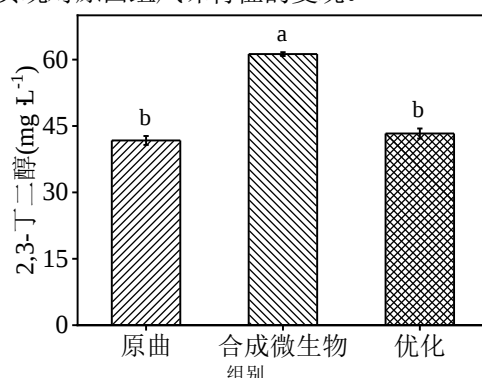


图 5 三组酒样中的 2,3-丁二醇含量

Fig.5 2,3-Butanediol content in three groups of baijiu samples

2.3 小规模生产验证优化合成微生物组功能性

以优化合成微生物组(优化)为实验组,原曲组为对照组,在 20 kg 实际生产规模中验证优化组的功能性。发酵结束后,对原曲组与优化组的各项理化性质进行统计分析,结果如图 6 所示。

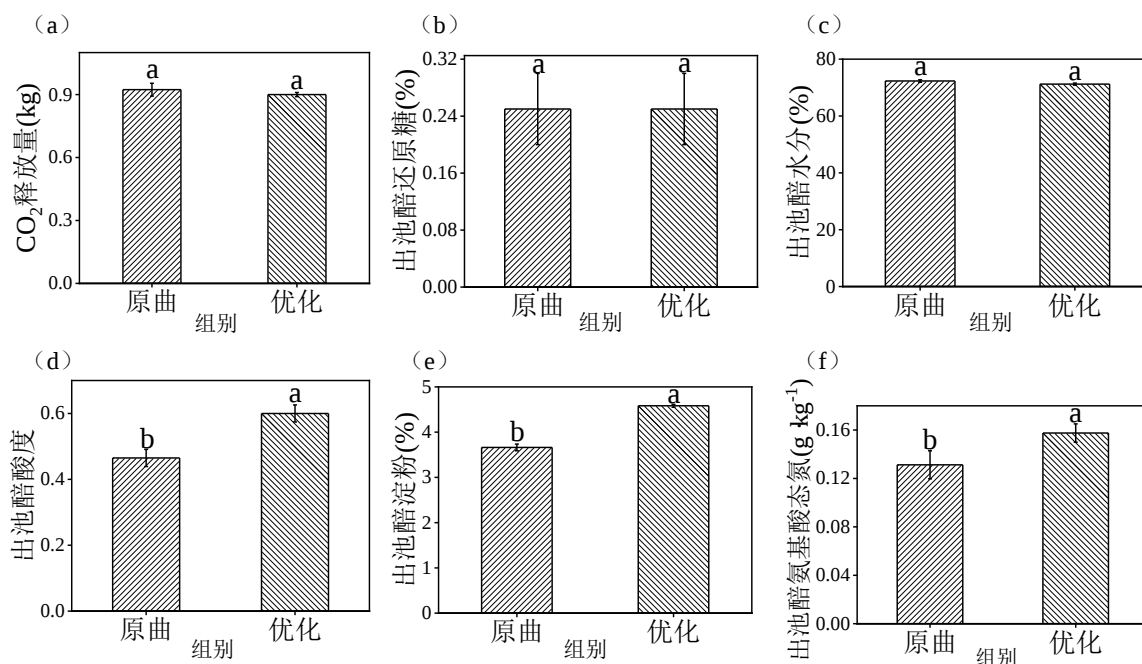


图 6 两组的理化性质分析

Fig.6 Physicochemical property analysis of two groups

注: (a) CO_2 释放量 (失重); (b) 还原糖含量; (c) 水分; (d) 酸度; (e) 淀粉含量; (f) 氨基酸态氮含量。

两组在 CO_2 释放量 (0.93、0.90 kg)、还原糖含量 (均约 0.24 wt.%)、水分 (72.32 wt.%, 71.21 wt.%) 间未出现显著性差异 ($P>0.05$)。而原曲组与优化组在酸度 (0.47、0.60)、淀粉含量 (3.67 wt.%, 4.58 wt.%)、氨基酸态氮含量 (质量浓度) (0.13、0.16 g kg^{-1}) 间存在显著性差异 ($P<0.05$) (图 6)。合成微生物群落可能通过巴氏醋酸菌与瑞士乳杆菌驱动有机酸积累^[35], 并通过解淀粉芽孢杆菌与根霉强化蛋白降解^[36], 使酸度与氨基酸态氮升高; 但酸积累抑制了淀粉酶活性, 导致淀粉水解受阻、残余淀粉含量升高。该现象反映出优化组在一定程度上强化了蛋白降解代谢。

本研究邀请省级白酒评委组成品评小组, 参照小曲清香型白酒感官评价规范^[37], 采用盲评方式对原曲组与优化组的酒样进行香气^[38]、口感、风味及风格典型性等维度的综合评定, 重点考察清香纯正度、糟香、醇甜感及杂味情况, 结果如图 7 所示。

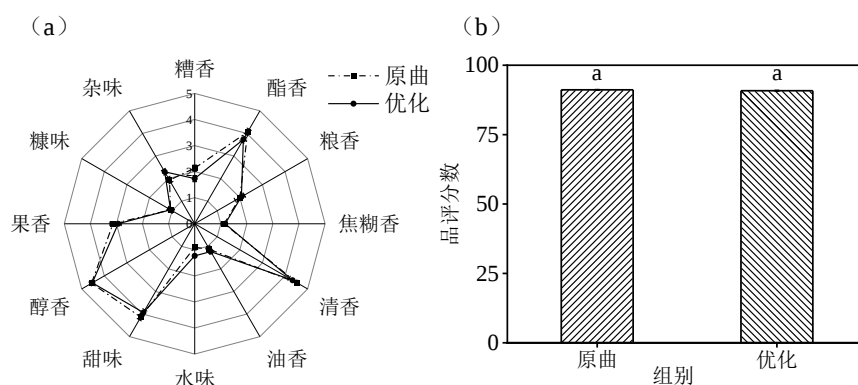


图 7 成品酒感官品评

Fig.7 Sensory evaluation of finished baijiu

注: (a) 感官品评风味图; (b) 品评分数。

感官品评结果显示, 两组酒样香气均以清香、醇香及甜香为主体核心特征, 具备小曲清香型白酒清雅纯正的风味特征, 而这一特征已在孙细珍等^[39]的研究中得到明确表征。两组均具备一定的糟香、粮香, 同时伴随轻微的焦糊香、油香; 甜味与果香强度相近 (图 7a)。两组酒样的品评分数均处于较高水平 (图 7b), 组间无显著性差异 ($P>0.05$), 均达到优级/一级小曲清香型白酒的品质标准, 表明优化组在调控风味物质代谢的同时, 未破坏白酒的核心感官品质。

两组酒样中的主要醇类物质 (质量浓度) 如图 8a 所示。无显著性差异 ($P>0.05$) 的有甲醇、正丙醇、2,3-丁二醇和 β -苯乙醇。2,3-丁二醇作为小曲清香型白酒中贡献甜味与醇厚感的关键风味醇类, 其含量在原曲组与优化组的酒样中分别为 6.18 mg L^{-1} 和 5.77 mg L^{-1} , 组间无显著性差异 ($P>0.05$)。优化组酒样中除了仲丁醇含量显著高于原曲组之外 ($P<0.05$), 其余三种高级醇: 异丁醇、正丁醇、异戊醇含量均显著低于原曲组 ($P<0.05$)。上述结果表明在原合成微生物组中通过增强酿酒酵母添加量的方式进行菌群重构, 不仅能在更大规模发酵条件下有效复现 2,3-丁二醇的产量, 使其与原曲组高度一致, 还能有效降低异丁醇、正丁醇、异戊醇的生成量, 从而减少饮酒后的不适感。

酸类物质是小曲清香型白酒风味的重要协调剂, 不仅直接影响酒体的酸味特征, Pang 等^[40]指出其还能作为前体物质参与酯类合成。如图 8b 所示, 本实验检测到四种有机酸均无显著性差异 ($P>0.05$)。

Ma 等^[41]指出酯类物质是白酒的主体香气成分, 其种类与含量决定了酒体的香气风格与浓郁度。分析显示小曲清香型白酒的主体风味物质——乙酸乙酯和乳酸乙酯含量在两组酒样中呈现出显著的组间差异 ($P<0.05$) (图 8c), 均表现为原曲组高于优化组。已有研究显示不同产地小曲白酒的乙酸乙酯/乳酸乙酯 (乙乳比) 存在显著差异 ($P<0.05$), 范围从 2.0 到 12.8 不等^[42], 乙乳比是一个受产地、原料、微生物群落等多种因素影响的动态变量^[43], 而非恒定不变的“标准值”。本研究中的优化组微生物组成相对于原曲组可能存在一定变化, 而该变化导致了乙乳比的变化, 但原曲组 (6.0) 和优化组 (2.5) 的乙乳比均处于该文献报道的合理区间内。

图 8d 表明醛类物质的组间差异主要集中于乙醛与乙缩醛 ($P<0.05$)。优化组酒样中的乙醛含量 (100.40 mg L^{-1}) 显著低于原曲组 (243.90 mg L^{-1}), 乙缩醛含量 (175.30 mg L^{-1}) 也显著低于原曲组 (461.50 mg L^{-1}), 优化组对乙

醛与乙缩醛的含量降幅分别达 58.90%和 62.00%。Li 等^[44]研究证实, *PDC* 催化的丙酮酸脱羧是乙醛生物合成的主要途径, 且 *PDC* 丰度与乙醛积累量呈正相关。优化组中携带 *PDC* 编码基因的真菌(如 *S. cerevisiae* 等)丰度可能相对较低, *PDC* 合成酶供应不足, 进而限制了丙酮酸向乙醛的转化效率。乙醛作为白酒中典型的刺激性风味物质, He 等^[45]认为其过量积累易导致酒体辛辣感增强、饮用舒适度下降, 优化组对乙醛的大幅削减, 可有效减轻乙醛带来的感官刺激与潜在健康风险。

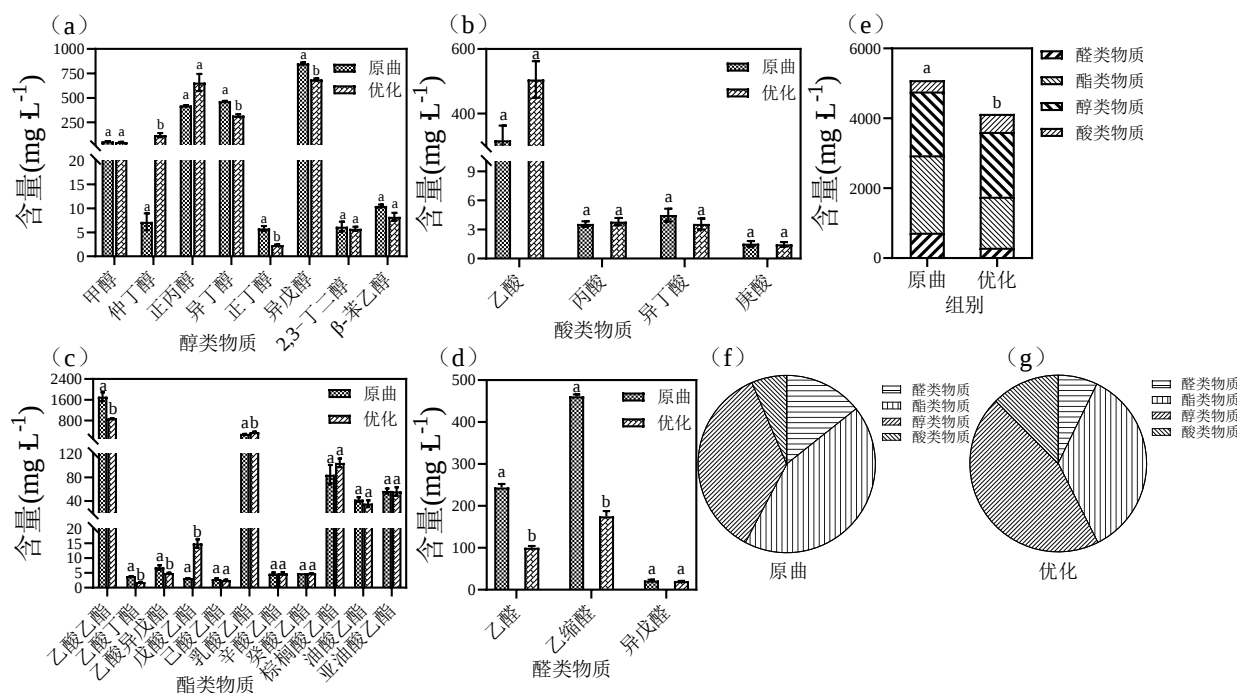


图8 成品酒风味物质指标

Fig.8 Flavor substance indicators of finished baijiu

注: (a) 醇类物质; (b) 酸类物质; (c) 酯类物质; (d) 醛类物质; (e) 风味物质总量; (f) 原曲组四大风味比例; (g) 优化组四大风味比例。

酯类物质在原曲组酒样中的风味物质占比最高, 为 43.40%; 其次是醇类物质 (35.80%); 醛类物质和酸类物质占比较低, 分别为 14.30%和 6.40% (图 8f)。相反, 醇类物质在优化组酒样中的风味物质占比最高, 为 44.90%; 其次是酯类物质 (35.40%); 醛类物质和酸类物质占比分别为 7.20%和 12.50% (图 8g)。与原曲组相比, 优化组的醇类、酸类物质占比均得到提升, 酯类、醛类物质占比则下降。两组酒样中风味物质总量上存在显著性差异 (图 8e)。

原曲组与优化组发酵终点的酒醅微生物物种组成分析如图 9 所示。在物种丰富度方面, 原曲组与优化组的 Chao1 指数 (分别为 1 528 和 1 478) 和 Observed_species 指数 (分别为 986 和 1 002) 均无显著性差异 ($P>0.05$) (图 9a、b), 表明合成微生物组的优化未改变酒醅微生物群落的整体物种丰富度, 完整保留了原有的微生物物种资源。而在物种多样性方面, 优化组 Shannon 指数 (2.89 ± 0.12) 显著高于原曲组 (2.28 ± 0.15) ($P<0.05$) (图 9c), 表明优化合成微生物组可显著提升酒醅微生物群落的多样性与均匀度, 使群落结构更为复杂稳定。

两组样本的物种组成均呈现出优势物种高度集中、低丰度物种多样分布的特征, 但群落结构存在显著分化 (图 9e): 原曲组以酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 为绝对优势物种, 群落结构呈现单一主导型; 优化组则表现为酿酒酵母与多种乳酸菌协同主导的均衡共生型结构, 物种分布更为均匀。

酿酒酵母是两组共有的绝对优势菌, 但其丰度在组间存在显著差异。原曲组中, 酿酒酵母相对丰度高达 55.00%, 样本间丰度高度一致; 优化组中酿酒酵母丰度下降至 18.00%, 同时以希氏乳杆菌 (*Lentilactobacillus hilgardii*) 为核心的乳酸菌类群显著富集, 形成酿酒酵母与乳酸菌协同主导的均衡共生型结构, 物种分布更为均匀, Hu 等^[46]的研究指出酿酒酵母在小曲清香型白酒发酵末期的丰度可达到 36.00%以上, 该丰度处于本实验中原曲组和优化组的酿酒酵母丰度之中。希氏乳杆菌为优化组的标志性优势乳酸菌。原曲组中, 希氏乳杆菌仅维持 8.00% 的低丰度; 优化组中, 其丰度骤升至 15.00%, 成为仅次于酿酒酵母的第二优势物种, 是优化组群落结构重塑的关

键类群，预示其在风味物质合成与发酵稳态维持中发挥核心作用。

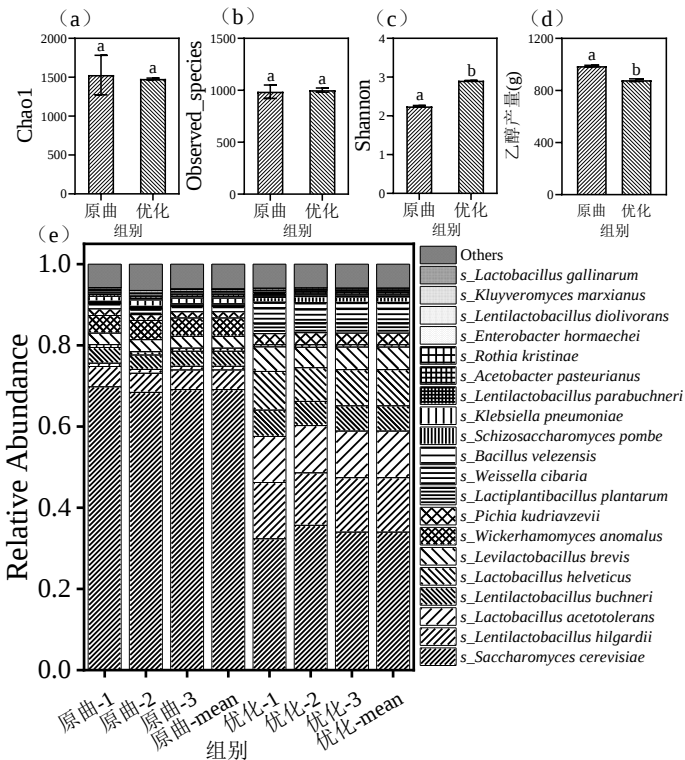


图9 微生物组成及乙醇产量

Fig.9 Microbial composition and ethanol production

注：(a) Chao1 指数；(b) Observed_species 指数；(c) Shannon 指数；(d) 两组乙醇产量；(e) 发酵酒醅微生物相对丰度。

优化组中乳酸菌类群整体丰度显著提升，形成了以希氏乳杆菌为核心的乳酸菌生态网络。布氏乳杆菌（*Lentilactobacillus buchneri*）在原曲组中约 1.50%，但优化组中丰度达 3.00%。耐酸乳杆菌（*Lactobacillus acetotolerans*）有助于增强发酵体系的酸碱缓冲能力，其在原曲组的丰度约 1.50%，而优化组提升至 13.00%。短乳杆菌（*Levilactobacillus brevis*）在原曲组丰度约 4.40%，优化组提升至 5.50%。类布氏乳杆菌（*Lentilactobacillus parabuchneri*）在原曲组微量存在，优化组丰度小幅提升至 0.70%。植物乳植杆菌（*Lactiplantibacillus plantarum*）在两组均约 0.80%。

对于两组中的其他真菌类群丰度变化而言，异常威克汉姆酵母（*Wickerhamomyces anomalus*）在原曲组丰度约 5.00%，优化组降至 0.40%。库德毕赤酵母（*Pichia kudriavzevii*）在原曲组中约 2.30%，而优化组提升至 3.00%。粟酒裂殖酵母（*Schizosaccharomyces pombe*）在原曲组中约为 0.40%，而优化组则增加到 1.30%。马克斯克鲁维酵母（*Kluyveromyces marxianus*）在两组中均为微量存在。

其他微生物的丰度变化如下，肺炎克雷伯菌（*Klebsiella pneumoniae*）在原曲组的丰度约为 1.00%，优化组进一步降低至 0.50%。食窦魏斯氏菌（*Weissella cibaria*）在原曲组微量存在，优化组丰度小幅提升至 2.70%。克氏罗氏菌（*Rothia kristinae*）在两组中均为微量存在，作为背景菌群无显著差异。Others：两组占比均稳定在 10.00%左右，为未注释的低丰度序列。

将两组蒸馏所得酒样折合为 95% vol，两组乙醇产量存在显著性差异（ $P<0.05$ ），原曲组乙醇产量为 987.61 g，优化组为 879.50 g（图 9d）。Cai 等^[47]的研究表明，酵母属是清香型白酒核心产酒精真菌，丰度与出酒效率显著正相关。本实验中，原曲组酿酒酵母相对丰度（55.00%）远高于优化组（18.00%），而酿酒酵母作为主导酒精发酵的功能菌株，其丰度差异直接导致原曲组底物转化与乙醇生成效率更高，最终表现为原曲组乙醇产量显著高于优化组。

3 结论

本研究以小曲清香型白酒核心微生物为研究对象，从合成微生物组构建与功能解析、优化调控及小规模生产

验证三个层面展开系统研究,主要结论如下:通过单菌种缺失发酵实验证实 10 种核心微生物均为小曲清香型白酒发酵的核心功能菌群;通过加倍添加酿酒酵母,实现合成微生物组的优化,复现了合成微生物组酒样中的 2,3-丁二醇含量。小规模生产验证表明优化组酒样虽然在整体风格上达到了优级/一级小曲清香型白酒标准,但产酒率和乙乳比仍然低于企业实际生产水平,因此后续有待对合成微生物组进行进一步优化,以期在不改变酒体风格和小曲清香风味协调性的前提下提升出酒率和乙乳比。

参考文献

- [1] YAN Q, ZHANG K, ZOU W, et al. Three main flavour types of Chinese baijiu: characteristics, research, and perspectives [J]. Journal of the Institute of Brewing, 2021, 127(4): 317-326.
- [2] TIAN L, XU P, QIN J, et al. Insights into the flavor profiles and key aroma-active compounds of sichuan xiaoqu qingxiangxing baijiu across distilling stages [J]. Foods, 2025, 14(16): 2814.
- [3] 唐洁,陈申习,张磊,等.绿衣观音土曲培养过程中微生物及酶系的动态变化[J].中国酿造,2020,39(5):97-104.
- [4] WANG Z, SU Z, YANG Q, et al. Characterizing relationship of microbial community in xiaoqu and volatiles of light-aroma-type xiaoqu baijiu [J]. Food Science and Technology Research, 2020, 26(6): 749-758.
- [5] LI C, HAN Y, ZOU X, et al. A systematic discussion and comparison of the construction methods of synthetic microbial community [J]. Synthetic and Systems Biotechnology, 2024, 9(4): 775-783.
- [6] WANG Z, WANG S, HE Q, et al. Ecological design of high-performance synthetic microbial communities: from theoretical foundations to functional optimization [J]. ISME Communications, 2025, 5(1): ycaf133.
- [7] HITCH T C A, BOSCH J, BOLSEGA S, et al. Function-based selection of synthetic communities enables mechanistic microbiome studies [J]. The ISME Journal, 2025, 19(1): wrsf209.
- [8] NIKOLOUDAKI O, AHETO F, DI CAGNO R, et al. Synthetic microbial communities: a gateway to understanding resistance, resilience, and functionality in spontaneously fermented food microbiomes [J]. Food Research International, 2024, 192: 114780.
- [9] MEHLFERBER E C, ARNAULT G, JOSHI B, et al. A cross-systems primer for synthetic microbial communities [J]. Nature Microbiology, 2024, 9(11): 2765-2773.
- [10] JOURDAIN L, GU W. Designing synthetic microbial communities for enhanced anaerobic waste treatment [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2025, 91(6): e00404-25.
- [11] JIN R, SONG J, LIU C, et al. Synthetic microbial communities: novel strategies to enhance the quality of traditional fermented foods [J]. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 2024, 23(4): e13388.
- [12] ZHANG Y, JING M, LYU L, et al. Principles for rigorous design and application of synthetic microbial communities [J]. Advanced Science, 2025: e14750.
- [13] YU Y, LIU J, ZHU Y, et al. Constructing a synthetic microbial community by analyzing the microorganisms responsible for the core flavor substances of zhenjiang aromatic vinegar and their interaction [J]. Food Bioscience, 2025, 71: 107025.
- [14] SADINENI V, KONDAPALLI N, OBULAM V S R. Effect of co-fermentation with *saccharomyces cerevisiae* and *torulaspora delbrueckii* or *metschnikowia pulcherrima* on the aroma and sensory properties of mango wine [J]. Annals of Microbiology, 2012, 62(4): 1353-1360.
- [15] GAO L, LU Y, LIU Z, et al. Microbial engineering for baijiu quality enhancement: insights and perspectives [J]. Trends in Food Science & Technology, 2025, 163: 105166.
- [16] LU Y, YAN Q, ZHANG K, et al. Generation of a synthetic autochthonous microbiota responsible for the essential flavors and brewing properties of daqu [J]. Food Research International, 2024, 197: 115180.
- [17] WANG H, WANG Y, RUAN Y, et al. Core microbes identification and synthetic microbiota construction for the production of xiaoqu light-aroma baijiu [J]. Food Research International, 2024, 183: 114196.
- [18] 王瑞鑫,高宇迪,刘晓妹,等.根霉菌添加量对小曲清香型白酒酒醅理化指标及基酒风味成分的影响[J].中国酿造,2025,44(5):161-168.
- [19] 吕林杰,杨生智,石应国,等.一种高酸高酯清香型小曲酒酿造工艺: 202210850664. 1[P]. 2023-11-17.
- [20] 沈怡方.白酒生产技术全书[M].第三版,北京:中国轻工业出版社,2005: 642-657.
- [21] 王斯维,王栋,陶玲玲,等.黄酒和米酒中氨基酸态氮测定方法的比较[J].食品与发酵工业,2019,45(23):232-238.

- [22] 阮玉磊.小曲清香型白酒合成微生物群落的构建[D].天津:天津科技大学,2023.
- [23] WANG B, WU Q, XU Y, et al. Synergistic effect of multiple saccharifying enzymes on alcoholic fermentation for Chinese baijiu production [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2020, 86(8): e00013-20.
- [24] JOSE-SALAZAR J A, BALLINAS-CESATTI C B, HERNÁNDEZ-MARTÍNEZ D M, et al. Kinetic evaluation of the production of mead from a non-saccharomyces strain [J]. Foods, 2024, 13(12): 1948.
- [25] 曹苗文,相里加雄,徐炳璋,等.功能型曲在清香型白酒生产中的应用[J].食品与发酵工业,2020,46(5):134-139.
- [26] 宋璐瑶,张邵森,钟太萍,等.高盐稀态酱醪中魏斯氏菌的筛选、性能及其对酱油风味的贡献[J].中国食品学报,2024,24(10):180-194.
- [27] OMAR M M. Isolation and identification of novel strain *rhizomucor miehei* produces acid protease as a rennet substitute by solid state fermentation and use soft Cheese-making [C]//IOP Conference Series: Earth and Environmental Science. IOP Publishing, 2025, 1449(1): 012155.
- [28] KARAPANAGIOTI F, OBERMAIER S, SLOTBOOM D J, et al. The *saccharomyces cerevisiae* amino acid transporter *Lyp1* has a broad substrate spectrum [J]. Febs Letters, 2025, 599(11): 1609-1621.
- [29] 张红霞.酱香型白酒酿造菌群形成规律及稳态调控机制研究[D].无锡:江南大学,2021.
- [30] FENG Y, CHEN A, CHEN K, et al. Effects of solid-state fermentation by *euotium cristatum* on the metabolic profile of angelica dahurica [J]. Foods, 2026, 15(7): 1238.
- [31] 任传英,卢淑雯,洪滨,等.糙米和大米非靶向代谢组学分析[J].食品科学,2022,43(20):183-190.
- [32] LIU M, LI S, WEISS T, et al. Solid-state fermentation of grain sorghum to produce Chinese liquor: effect of grain properties and fermenting culture [J]. Journal of Cereal Science, 2023, 114: 103776.
- [33] ANTAL E, KÁLLAY M, VARGA Z, et al. Effect of botrytis cinerea activity on glycol composition and concentration in wines [J]. Fermentation, 2023, 9(5): 493.
- [34] 马世源,李子健,罗惠波,等.酿酒酵母对浓香型白酒酒醅微生物群落结构及功能的影响[J].中国食品学报,2024,24(2):71-82.
- [35] TANG J, LIU Y, LIN B, et al. Effects of ultra-long fermentation time on the microbial community and flavor components of light-flavor xiaoqu baijiu based on fermentation tanks [J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2022, 38(1): 3.
- [36] WANG Q, WANG C Y, XIANG X Q, et al. Analysis of microbial diversity and succession during xiaoqu baijiu fermentation using high-throughput sequencing technology [J]. Engineering in Life Sciences, 2022, 22(7): 495-504.
- [37] GB/T 10781. 2-2022.白酒质量要求第 2 部分: 清香型白酒: [S].
- [38] WANG Z, HAO W, WEI J, et al. Unveiling innovation in aroma attribute evaluation of niulanshan baijiu: an advanced exploration of two different processing methods via food sensory omics and penalty analysis [J]. Food Chemistry: X, 2023, 19: 100852.
- [39] 孙细珍,杜佳炜,黄盼,等.现代工艺和传统工艺酿造小曲清香型白酒感官表征及风味成分分析[J].食品科学,2021,42(6):282-290.
- [40] PANG X N, CHEN C, HUANG X N, et al. Influence of indigenous lactic acid bacteria on the volatile flavor profile of light-flavor Baijiu [J]. LWT, 2021, 147: 111540.
- [41] MA Y, WEI Z, XIAO X, et al. Investigating the impact of various sorghum types on the key aroma compounds of sichuan xiaoqu baijiu through application of the sensomics approach [J]. Food Chemistry: X, 2024, 22: 101367.
- [42] 陈燕梅.川法小曲白酒风味品质特征解析[D].成都:成都大学,2024.
- [43] 马丹,张秋波,王涵,等.小曲清香型白酒酿造中乳酸杆菌的演替及优势乳酸杆菌发酵特性分析[J].微生物学报,2025,65(10):4667-4683.
- [44] LI C, YANG F, HAN Y, et al. Aldehyde metabolism in maotai-flavor baijiu: insights from integrated metagenomic and metaproteomic analyses [J]. Food Research International, 2025: 117518.
- [45] HE Y, TANG K, YU X, et al. Identification of compounds contributing to trigeminal pungency of baijiu by sensory evaluation, quantitative measurements, correlation analysis, and sensory verification testing [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2021, 70(2): 598-606.
- [46] HU Y, YANG Q, CHEN D, et al. Study on microbial communities and higher alcohol formations in the fermentation of Chinese xiaoqu baijiu produced by traditional and new mechanical technologies [J]. Food Research International, 2021, 140: 109876.
- [47] CAI W, WANG Y, LIU Z, et al. Depth-depended quality comparison of light-flavor fermented grains from two fermentation rounds [J]. Food Research International, 2022, 159: 111587.