

谷晓东, 刘怡琳, 席晓丽, 等. 基于高通量测序技术对 6 种黄酒酒曲中微生物多样性的研究 [J]. 食品工业科技, 2022, 43(16): 148–157. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2021120063

GU Xiaodong, LIU Yilin, XI Xiaoli, et al. Microbial Diversity in Six Kinds of Huangjiu Koji Based on High-Throughput Sequencing Techniques[J]. Science and Technology of Food Industry, 2022, 43(16): 148–157. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2021120063

· 生物工程 ·

基于高通量测序技术对 6 种黄酒酒曲中微生物多样性的研究

谷晓东¹, 刘怡琳², 席晓丽¹, 陈志周^{1,3,*}, 马艳莉^{1,2,*}, 刘旭¹, 王印壮¹, 李素萍¹

(1. 河北农业大学食品科技学院, 河北保定 071000;

2. 南阳理工学院张仲景国医国药学院, 河南南阳 473004;

3. 河北农业大学机电工程学院, 河北保定 071001)

摘要: 本研究以 6 种黄酒酒曲为原料, 利用高通量测序技术, 研究酒曲中细菌和真菌的微生物群落结构及其多样性。结果显示, 大米红曲 (JQ1)、小米红曲 (JQ2) 的细菌群落结构及真菌群落结构都相似; 麦曲 (JQ3)、中药曲 (JQ4)、酒药 (JQ6) 的细菌群落结构接近; JQ3、JQ4、黄酒曲 (JQ5) 的真菌群落结构接近。在门水平上, 厚壁菌门 (Firmicutes) 是 JQ2、JQ3、JQ4、JQ6 优势细菌门; JQ1、JQ5 优势细菌门为变形杆菌门 (Proteobacteria)。6 种酒曲的优势真菌门是子囊菌门 (Ascomycota)。在属水平上, 乳酸杆菌属 (*Lactobacillus*) 是 JQ1 优势细菌属; 双歧杆菌属 (*Bifidobacterium*) 是 JQ2 优势细菌属; JQ3、JQ5 优势细菌属为未培养叶绿体细菌属 (uncultured bacterium_o_Chloroplast); 枝芽孢菌属 (*Virgibacillus*) 仅为 JQ4 优势细菌属; 葡萄球菌属 (*Staphylococcus*) 是 JQ6 优势细菌属。JQ1 优势真菌属为塞伯林德纳氏酵母属 (*Cyberlindnera*), JQ2 优势真菌属为红曲霉属 (*Monascus*), JQ3、JQ5 优势真菌属为曲霉属 (*Aspergillus*); JQ4 优势真菌属是耐干霉菌属 (*Xeromyces*), 米根霉属 (*Rhizopus*) 是 JQ6 优势真菌属。综上, 6 种酒曲的微生物群落结构在门和属水平上都有较大差异, 本文为后续红谷黄酒酒曲的筛选提供了理论参考。

关键词: 微生物多样性, 高通量测序, 菌落结构, 黄酒酒曲, 理化性质

中图分类号: TS261.1

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2022)16-0148-10

DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2021120063



本文网刊:

Microbial Diversity in Six Kinds of Huangjiu Koji Based on High-Throughput Sequencing Techniques

GU Xiaodong¹, LIU Yilin², XI Xiaoli¹, CHEN Zhizhou^{1,3,*}, MA Yanli^{1,2,*}, LIU Xu¹, WANG Yin Zhuang¹, LI Suping¹

(1. College of Food Science and Technology, Hebei Agricultural University, Baoding 071000, China;

2. Zhang Zhongjing School of Chinese Medicine, Nanyang Institute of Technology, Nanyang 473004, China;

3. College of Mechatronical and Electrical, Hebei Agricultural University, Baoding 071001, China)

Abstract: In this study, six kinds of Huangjiu koji were used as raw materials to study the microbial community structure and diversity of bacteria and fungi by using high-throughput sequencing technique. The results showed that the bacterial community structure and fungal community structure of rice red koji (JQ1) and millet red koji (JQ2) were similar, the bacterial community structure of wheat koji (JQ3), traditional Chinese medicine koji (JQ4) and alcohol medicine (JQ6)

收稿日期: 2021-12-07

基金项目: 国家自然科学基金 (31601462); 南阳市科技重大专项 (2019ZDZX10); 河南省工业微生物资源与发酵技术重点实验室开放课题 (HIMFT20190307, HIMFT20190308); 河南省高等学校青年骨干培养计划 (2020GGJS226)。

作者简介: 谷晓东 (1996-), 男, 硕士研究生, 研究方向: 食品工程, E-mail: 1921261906@qq.com。

* 通信作者: 陈志周 (1968-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 食品包装材料与技术, E-mail: chenzhizhou2003@126.com。

马艳莉 (1982-), 女, 博士, 教授, 研究方向: 食品营养与安全, E-mail: myl_dz@sina.com。

were similar, and the fungal community structures of JQ3, JQ4 and sweet koji (JQ5) were similar. At the gate level, Firmicutes was the dominant bacterial phylum of JQ2, JQ3, JQ4 and JQ6. The dominant bacteria of JQ1 and JQ5 were Proteobacteria. The dominant fungal phylum of 6 kinds of koji was Ascomycota. At the genus level, *Lactobacillus* was the dominant genus of JQ1, *Bifidobacterium* was the dominant genus of JQ2, uncultured_bacterium_o_Chloroplast was the dominant genus of JQ3 and JQ5, *Virgibacillus* was only the dominant genus of JQ4, and *Staphylococcus* was the dominant genus of JQ6. The dominant fungi in JQ1 were *Cyberlindnera*, *Monascus* in JQ2, *Aspergillus* in JQ3 and JQ5, *Xeromyces* in JQ4 and *Rhizopus* in JQ6. It was suggested that, the microbial community structure of six kinds of koji were quite different at the gate and genus level, which would provide a theoretical reference for the follow-up screening of red millet Huangjiu koji.

Key words: microbial diversity; high-throughput sequencing; colony structure; Huangjiu koji; physicochemical property

黄酒是我国一种传统的发酵酒精饮品^[1],其历史悠久,大概已有 7000 多年^[2],是中国民族酒类之一,与啤酒、葡萄酒并称为世界三大古酒^[2-3]。因其营养丰富,且具有独特的风味^[4],素有“酒中之祖、液体蛋糕”之美誉,深受消费者的喜爱^[5]。我国黄酒产地颇多,分布广泛^[6],通常传统工艺是以富含淀粉的糯米、黍米、小米、玉米、高粱等谷物为原料^[7],以曲药作为糖化发酵剂,经过浸米、蒸米、摊凉、落缸、拌曲、发酵、压榨、澄清、过滤、杀菌等过程酿造而成^[8]。红谷是河南省南阳盆地的特色农作物,外壳呈红色,脱壳后得到的小米也称红小米,其性温,是药食两用食材,具有清热止渴、滋阴补肾、健脾暖胃之功效^[9],且富含多种营养物质、比例协调^[10]。红谷黄酒是以红谷为原料经过传统工艺酿造而成。

与传统酿造食品相同,黄酒的酿造过程也是开放式发酵,环境中的微生物会与主要酿造微生物一起参与发酵过程,从而影响黄酒风味物质的形成^[11-12]。酒曲是酿造传统黄酒的重要原料之一,常被誉为“酒之骨”^[13],酒的好坏与酒曲密不可分。酒曲中含有种类繁多的微生物,既有细菌,又有酵母、霉菌等真菌^[14]。霉菌、酵母和细菌被认为能产生大量的酶,用于细胞新陈代谢和随后的小分子生成,这些酶有助于最终产品中风味的形成^[1]。微生物的多种代谢产物对酒的风味、口感、质量、功能都有着非常重要的作用。因此,对于酒曲微生物的多样性分析在黄酒品质的稳定和提升等方面有着重要的现实意义^[15]。

高通量测序技术可以准确大规模的分析微生物的组成,客观全面的分析微生物的群落结构^[16]。沈馨等^[17]采用高通量测序技术对 3 个孝感凤窝酒曲的细菌多样性分析发现,凤窝酒曲中存在大量的核心细菌菌群。Cai 等^[18]对 8 个发酵剂样品进行了高通量测序,鉴定出 10 属酵母和霉菌,11 属细菌;真菌多样性分析表明,发酵剂样品中的真菌成分存在显著差异,发酵剂微生物群主要以根霉属为主,表明其在甜黄酒酿造过程中淀粉水解中的重要作用。朱小芳等^[19]通过现代分子生物学技术,研究了传统黄酒浸米浆水中的细菌群落结构,发现乳酸菌是浸米浆水中的优势细菌,种类繁多且数量占据优势。因此,高通量测序技术具有高通量、高分辨率、成本低、能够双向测序等

优点,能够准确快速的分析出样品中复杂的微生物群落结构,是样品中复杂微生物多样性分析的最佳方法^[20-21]。

黄酒生产用曲分为大曲(例如大米红曲、小米红曲、麦曲)、小曲(例如中药曲、药曲),也有人使用黄酒曲酿酒。本研究所选用的酿酒原料“红谷”是一种新兴的黄酒酿造原料,在其研究过程中多为原料特性及工艺研究,而哪种酒曲更适用于其发酵酿造高品质黄酒还未被研究。故本研究采用高通量测序技术对黄酒 6 种不同酒曲微生物多样性及群落结构进行分析,旨在为后续红谷黄酒发酵最优酒曲的选择及研究提供理论参考。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

大米红曲(JQ1) 福建省古田县程久红糴有限公司;小米红曲(JQ2) 河南南阳润之酒业;麦曲(JQ3) 随州市大洪山绿色生态保健食品有限公司;中药曲(JQ4) 江苏微康生物科技有限公司;黄酒曲(JQ5) 安琪酵母股份有限公司;酒药(JQ6) 湖北楚寨发酵制品有限公司;红谷 河南南阳当地超市;甲醛(38%) 洛阳市化学试剂厂;氢氧化钠 天津市风船化学试剂科技有限公司;葡萄糖、苯酚 天津市科密欧化学试剂有限公司;3,5-二硝基水杨酸 天津市光复精细化工研究所;酒石酸钾钠、无水亚硫酸钠 天津市光复科技发展有限公司;盐酸 洛阳昊华化学试剂有限公司;以上试剂均为分析纯;Power-Soil® DNA Isolation Kit 试剂提取盒 深圳市安必胜科技有限公司;KOD FX Neo 聚合酶、KOD FX Neo 缓冲液 东洋纺(上海)生物科技有限公司;脱氧核苷三磷酸(dNTP) 上海源叶生物科技有限公司;ddH₂O 上海谱振生物科技有限公司;OMEGA DNA 纯化柱 广州飞扬生物工程有限公司。

5424R 型高速冷冻离心机 上海力申科学仪器有限公司;PAL- α 型糖度计 日本爱拓公司;ME204E 型电子分析天平 梅特勒-托利仪器(上海)有限公司;PHS-3C 型 pH 计 上海仪电科学仪器股份有限公司;DYY-5 型琼脂糖凝胶电泳仪 北京六一仪器厂;101 型电热鼓风干燥箱 北京市永光明医疗仪器厂;725N 型紫外可见分光光度计 上海仪电分析仪

器有限公司; DZKW-4 型电热恒温水浴锅 北京中兴伟业仪器有限公司; ZNCL-BS 型磁力搅拌器 上海卓越仪器设备有限公司; NanoDrop 2000 超微量分光光度计 上海在途生物科技有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 不同酒曲红谷黄酒发酵过程中理化指标的测定 选择不同酒曲(大米红曲、小米红曲、麦曲、中药曲、黄酒曲、酒药)进行发酵实验, 料液比(红谷:酒曲:水)控制在 1:0.16:0.5(g/g/mL)将蒸熟晾凉后的红谷、酒曲、水混合均匀, 落料品温控制在 28~30 ℃; 前发酵维持 7 d, 发酵温度为 28~32 ℃; 后发酵时间为 23 d, 控制温度 25~26 ℃ 酿造红谷黄酒并对成品中的基本理化指标进行测定, 并进行感官品鉴。样品分析前采用 8000 r/min 离心 10 min, 取上清液测定。酒精度、pH、总酸、氨基态氮含量: 按照 GB/T 13662-2018《黄酒》测定; 总糖、还原糖含量: 采用 3,5-二硝基水杨酸(DNS)法测定^[22]; 可溶性固形物: 使用糖度计直接测定; 出糟率: 参照油卉丹^[23]的方法。

1.2.2 黄酒感官品评 如表 1, 感官品鉴参考黄酒国标要求, 邀请 11 名经过培训的专业评价员在感官评定实验室评定打分: 第一步, 小组成员观察, 品尝和嗅探黄酒, 以识别和记录所有感官属性。第二步, 小组成员讨论并确定属性, 然后根据提供的标准建立最终的描述符。黄酒的 4 个描述词包括色泽(透明, 较透明和浑浊), 香气(浓郁和较浓郁), 口感(爽口, 较爽口和不爽口)和风格(协调, 较协调和不协调)。在最后一步, 要求小组成员通过量化每个感官描述符来表达自己的判断。

表 1 黄酒评分标准
Table 1 Rating standard of Huangjiu

项目	评定标准	得分(分)
色泽(20分)	清亮透明, 有光泽, 瓶底有微量聚集物	15~20
	清亮透明, 色泽正常, 瓶底有少量聚集物	10~14
	色泽暗淡浑浊, 瓶底有大量聚集物	0~9
香气(30分)	具有黄酒特有的醇香浓郁, 无异香	20~30
	黄酒特有的醇香较浓郁, 无异香	10~19
	不具有黄酒特有的醇香, 有异味	0~9
口味(25分)	酒品醇和, 爽口, 无异味	20~25
	酒品醇和, 较爽口, 无异味	10~19
	酒品不醇和爽口, 有异味	0~9
风格(25分)	酒体协调, 北京擎科生物科技有限公司具有黄酒的典型风格	20~25
	酒体较协调, 具有黄酒的典型风格	10~19
	酒体不协调, 不具有黄酒的典型风格	0~9

1.2.3 DNA 的提取和 PCR 扩增 采用 PowerSoil[®] DNA Isolation Kit 试剂提取盒提取酒曲微生物宏基因组的总 DNA, 用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 提取结果, 用 NanoDrop 2000 超微量分光光度计检测 DNA 提浓度和纯度。以提取的 DNA 为模板, 根据引物 338F(5'-ACTCCTACGGGAGGCAGCA-3')

和 806R(5'-GGACTACHVGGGTWTCTAAT-3')对细菌 16S rDNA 的 V3 和 V4 区扩增。根据引物 ITS1F(5'-CTTGGTCATTAGAGGAAGTAA-3')和 ITS2(5'-GCTGCGTTCTTCATCGATGC-3')对真菌 ITS1 区域的扩增。

DNA 模板 50 ng, 正向和反向引物各 0.9 μL, KOD FX Neo 聚合酶 0.6 μL, KOD FX Neo 缓冲液 15 μL, 脱氧核苷三磷酸(dNTP)6 μL, 加入 ddH₂O 定容至 30 μL。PCR 扩增程序: 98 ℃ 预变性 2 min; 98 ℃ 变性 30 s, 50 ℃ 退火 30 s, 72 ℃ 延伸 60 s, 30 个循环; 72 ℃ 延伸 5 min, 4 ℃ 保存。

1.2.4 高通量测序 PCR 产物通过 1.8% 琼脂糖凝胶回收, 利用 OMEGA DNA 纯化柱进行纯化, 用 1.8% 琼脂糖凝胶电泳检测, 文库构建和测序由北京擎科生物科技有限公司 Illumina Novaseq6000 PE250 平台来完成。以上 DNA 的提取、PCR 扩增及高通量测序均由北京擎科生物科技有限公司完成。

1.3 数据处理

测序得到的数据是双端序列的, 首先将成对的 Reads 拼成一条序列, 对拼接效果进行质量控制和过滤, 然后根据引物序列和序列首末两端的 barcode 进行区分样品并得到有效序列, 经过校正序列方向后, 即为优化数据。使用 Usearch 软件, 对前述得到的优化序列按 97% 的相似度进行操作分类单元(Operational Taxonomic Units, OTUs)划分, 构建稀疏曲线(Rarefaction curves), 计算样品中微生物均匀度和丰富度指数, 并统计分析细菌和真菌群落信息。

2 结果与分析

2.1 不同酒曲红谷黄酒发酵过程中理化性质分析

由表 2 可知, 小米红曲酿造的样品酒精度最高, 达到 13.78%vol, 与其他组有显著性差异($P<0.05$)。其他发酵组的样品酒精度都大于 11%vol, 满足《黄酒》标准酒精度 $\geq 8.0\%$ vol 的要求。红谷黄酒采用半固态法酿制, 酒曲是决定能否正常发酵以及发酵产品质量好坏的决定性因素。在酿酒期间, 红谷黄酒的酒精度随发酵进行而剧升, 酵母等微生物快速繁殖, 将前期产生的可发酵糖转化成酒精^[18], 物料下沉, 7 d 左右酒醪上层液体澄清, 之后缓慢发酵, 25~30 d 发酵完成。

各发酵酒样中 pH 在 3.5~4.6 范围内(表 2), 符合黄酒酸度要求。氨基态氮是以氨基酸形式存在的氮元素, 它的含量高低影响了黄酒的感官等级和质量风格。根据 GB/T 13662-2018《黄酒》标准, 非稻米黄酒的氨基态氮含量 ≥ 0.16 g/L 即表示发酵达到要求。发酵醪液中乳酸杆菌等微生物分泌的酸性蛋白酶, 能分解表皮蛋白, 可溶于水的小分子氨基酸、呈味肽等活性成分被分泌出来^[24]。在发酵组中, 用小米红曲酿造的黄酒中氨基酸态氮水平较高, 使红谷中的蛋白质资源得到了有效的利用, 增加了酒体鲜味。

表 2 不同酒曲酿制的红谷黄酒理化指标

Table 2 Physiochemical indexes of red millet Huangjiu brewed with different koji

参数	大米红曲	小米红曲	麦曲	中药曲	黄酒曲	酒药	标准
酒精度(%vol)	12.69±0.11 ^c	13.78±0.04 ^a	11.68±0.12 ^c	11.03±0.05 ^f	13.22±0.10 ^b	12.08±0.06 ^d	≥8.0
pH	3.84±0.01 ^b	3.83±0.01 ^b	3.80±0.01 ^b	3.54±0.01 ^d	3.62±0.01 ^c	4.11±0.01 ^a	3.5~4.6
总酸(g/L)	7.72±0.12 ^c	7.11±0.09 ^e	7.47±0.13 ^d	9.08±0.03 ^a	8.17±0.05 ^b	4.16±0.08 ^f	3.0~10.0
氨基酸氮(g/L)	0.70±0.03 ^d	1.02±0.02 ^a	0.81±0.04 ^c	0.87±0.01 ^b	0.58±0.05 ^e	0.27±0.02 ^f	≥0.16
可溶性固形物(Brix%)	11.8±0.10 ^b	12.9±0.10 ^a	11.3±0.10 ^c	10.9±0.10 ^d	8.7±0.10 ^e	8.1±0.10 ^f	—
还原糖(g/L)	4.55±0.01 ^d	7.22±0.04 ^a	5.98±0.06 ^c	6.21±0.09 ^b	3.49±0.04 ^f	4.28±0.04 ^e	—
总糖(g/L)	6.51±0.02 ^e	9.18±0.01 ^c	9.49±0.06 ^b	10.39±0.04 ^a	5.14±0.07 ^f	7.63±0.04 ^d	≤15.0
出糟率(%)	37.26±0.33 ^b	18.58±0.12 ^f	35.05±0.26 ^e	38.14±0.18 ^a	34.59±0.20 ^d	28.95±0.13 ^e	—

注: 数值表示为平均值±标准偏差; 同一行中的不同字母根据Duncan测验($P<0.05$)有显著差异; 标准为GB/T 13662-2018《黄酒》非稻米传统型黄酒标准。

在酿造期间, 原料在各种水解酶的作用下, 细胞内容物溶出, 发酵醪中可溶性固形物也增加^[25]。各发酵组间差异显著($P<0.05$), 由表 2 可知, 小米红曲酿造的黄酒的可溶性固形物含量较高, 为 12.9Brix%。

由表 2 可知, 总糖和还原糖呈现相似特征, 以黄酒曲和酒药为发酵剂酿制的黄酒样品显示出较好的还原糖代谢能力。六种酒曲酿造黄酒样品的出糟率高低依次为小米红曲<酒药<黄酒曲<麦曲<大米红曲<中药曲, 发酵组之间存在显著性差异($P<0.05$)。出糟率与原料的淀粉利用率是成反比的, 所以造成这种情况的原因是小米红曲中的微生物发酵时能分泌大量的糖化酶, 落料后饭粒能很好糖化溶解, 增加了淀粉的利用率, 而中药曲发酵时醪液呈糨糊状, 从而降低淀粉酶解速率。

2.2 不同酒曲黄酒的感官评价

黄酒的感官分析, 即通过产品的外观、香气、口味、风格得到黄酒的整体印象, 可以直观反映黄酒香气强弱及优劣程度。6 组黄酒感官评价结果如表 3。在感官指标方面, 黄酒外观呈红色(大米红曲、小米红曲), 白色(酒药), 黄色(麦曲、中药曲、黄酒曲), 清透明亮, 有晶莹光泽, 酒液底部显示少量聚集物, 有黄酒独有的浓郁、爽口感。6 组黄酒按感官评分由高到低依次为小米红曲, 大米红曲, 黄酒曲, 酒药, 麦曲, 中

药曲。由此而言, 这表明酒曲的种类对黄酒酿造有重要影响。

2.3 红谷黄酒酒曲中微生物多样性分析

基于 ITS1 和 16S rRNA 测序, 观察到的 OTU 稀疏曲线、ACE 指数、丰富度(Chao 1)指数、香浓(Shannon)指数、相对丰度被用于评估 6 种黄酒酒曲样品中的真菌和细菌多样性、丰度。测序数据和分析表明, ITS1 和 16S rRNA 基因的文库通常构建良好。

2.3.1 OTU 聚类及稀释曲线分析 为了解并分析试验样本测序结果包含的菌属等信息, 对 Reads 在 97.0% 的相似度水平下进行预聚类、并将其分类为 OTUs, 每个 OTU 对应于一种代表序列, 然后基于 OTU 进行物种注释, 利用聚类程序 Usearch 软件, 对这些序列进行聚类后, 各样品 OTU 的个数不同, 黄酒酒曲样品中所含 OTU 数量如表 4。

由表 4 可知, 6 种黄酒酒曲中, 细菌和真菌 OTU 总数分别为 477 和 214, 细菌 OTU 数目均大于真菌 OTU 数目。JQ3、JQ4 中细菌、真菌 OTU 数目最多, JQ1 中细菌、真菌 OTU 数目最少。

在相同的测序深度下, 还可以比较不同样本中 OTU 的数目, 在一定程度上评判样本的多样性高低。稀释曲线如图 1 所示, 对于细菌, 当测序量小于 10000 时, OTU 数目快速增加, 在序列数目为 10000~

表 3 不同酒曲酿制的红谷黄酒感官品评价

Table 3 Sensory evaluation of red millet Huangjiu brewed with different koji

参数	大米红曲	小米红曲	麦曲	中药曲	黄酒曲	酒药
外观	橙红色	朱红色	黄褐色	深褐色	浅褐色	米白色
香气	浓郁	浓郁	较浓郁	较浓郁	浓郁	浓郁
口味	爽口	爽口	爽口	较爽口	爽口	爽口
风格	协调	协调	较协调	协调	较协调	较协调
感官评分(分)	81.8±10.0 ^a	82.8±11.6 ^a	72.4±4.2 ^b	71.8±4.5 ^b	78.5±4.8 ^{ab}	74.9±10.4 ^{ab}

注: 数值表示为平均值±标准偏差; 同一行中的不同字母根据Duncan测验($P<0.05$)有显著差异。

表 4 不同酒曲样品细菌和真菌 OTU 数目

Table 4 Number of bacterial and fungal OTUs in different rice wine kojis samples

样品	JQ1	JQ2	JQ3	JQ4	JQ5	JQ6
细菌	308	346	402	389	306	325
真菌	85	101	118	113	113	101

70000 之间时,除发酵剂 JQ2 样品外,随着序列数的增加,OTU 数目增加走势趋于平缓,表明测序趋于饱和,当前测序结果可以足够反映样本中微生物多样性。对于真菌,当序列数目小于 20000 时,样本的 OTU 快速增加;当序列数目大于 20000 时,除发酵剂 JQ3 和 JQ1 样品快速增加外,大部分样本的 OTU 缓慢增加。虽然真菌稀释曲线还未达到平台期,但是每个样品测序覆盖率均超过 99.95%;这表明即使测序深度和测序量的增加可能会继续发现新的种属,但是酒曲中的微生物多样性却不会随测序的增大而改变,当前测序结果可以足够反映样本中微生物多样性^[26]。

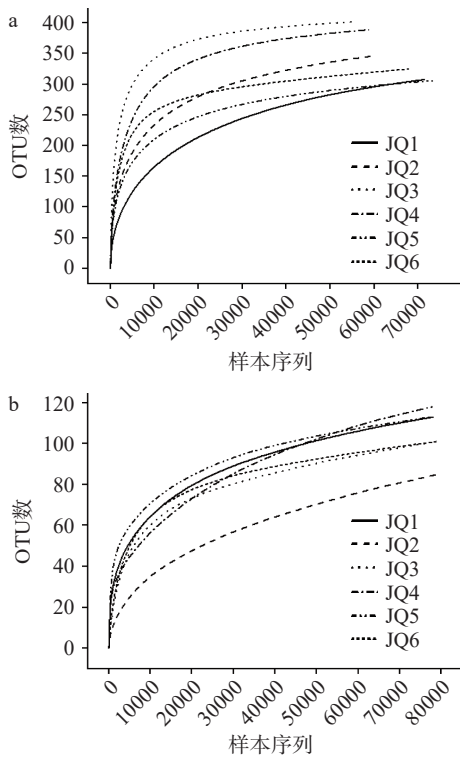


图 1 细菌和真菌稀释曲线

Fig.1 Bacteria and fungi rarefaction curve

注: a.细菌; b.真菌; 图 2 同。

2.3.2 不同酒曲微生物的 Alpha 多样性分析 由表 5 可知,6 种酒曲样品经测序后共获得 445483 条高质量细菌序列。在 97% 相似度情况下,细菌 ACE 指数在 332.99~411.07 之间,Shannon 指数在 3.73~6.02 之间,Chao 1 指数在 349.05~460.14 之间,覆盖率范

围 99.91%~99.99%。JQ3、JQ4 的细菌 Chao 1 指数和 ACE 指数均处于较高的数值,这表明 JQ3、JQ4 的细菌群落丰富多较高,其群落结构较为复杂。如图 2a 所示,随着测序量的增加物种的数量也在增加,但是 Shannon 曲线却进入平缓期,趋于稳定,这表明物种数量达到饱和,即使有新的细菌物种产生,但是细菌的多样性也不会随着测序量的增加而发生变化。

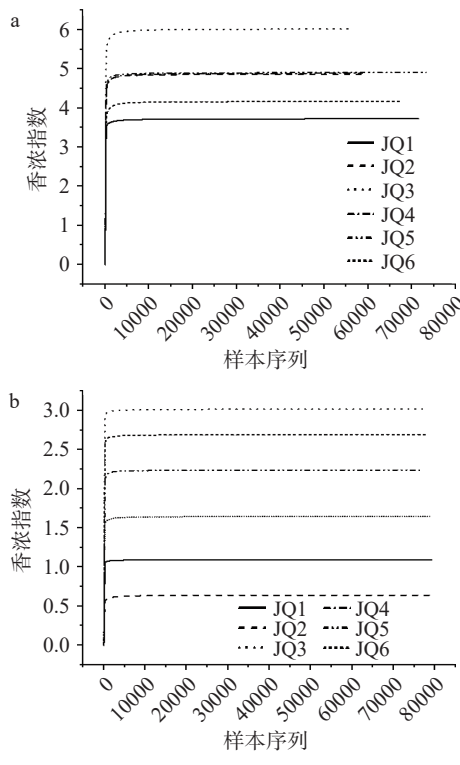


图 2 六种酒曲中细菌和真菌的 Shannon 指数图

Fig.2 Shannon index of bacteria and fungi in six rice wine kojis

6 种酒曲样品经测序后共获得 476726 条高质量真菌序列。在 97% 相似度情况下,真菌 ACE 指数在 119.40~190.60 之间,Shannon 指数在 0.64~3.02 之间,Chao 1 指数在 143.00~162.40 之间,覆盖率范围 99.95%~99.97%。JQ1、JQ3 的真菌 Chao1 指数和 ACE 指数均处于较高的数值,这表明 JQ1、JQ3 的真菌群落丰富多较高,其群落结构较为复杂;如图 2b 所示,随着测序量的增加物种的数量也在增加,但是 Shannon 曲线却进入平缓期,趋于稳定,这表明物种数量达到饱和,即使有新的真菌物种产生,

表 5 不同酒曲细菌和真菌多样性指数表

Table 5 Diversity index of bacteria and fungi in different rice wine kojis samples

样品	序列数		Shannon 指数		ACE 指数		Chao 1 指数		覆盖率	
	细菌	真菌	细菌	真菌	细菌	真菌	细菌	真菌	细菌	真菌
JQ1	74964	79409	3.73	1.10	361.93	190.60	366.65	151.11	0.999	0.9996
JQ2	68006	79611	4.86	0.64	382.76	152.30	391.00	147.43	0.9991	0.9997
JQ3	73705	79521	6.02	3.02	411.07	153.38	418.50	162.40	0.9996	0.9995
JQ4	71004	79671	4.89	2.69	406.26	136.65	415.25	156.87	0.9994	0.9997
JQ5	77663	79055	4.91	2.24	332.99	131.21	349.05	144.62	0.9994	0.9997
JQ6	80141	79459	4.17	1.64	370.06	119.40	460.14	143.00	0.9994	0.9997
总计	445483	476726								

但是真菌的多样性也不会随着测序量的增加而发生变化。

实验样品中细菌的 Chao 1 指数和 ACE 指数均远大于真菌的指数,这表明 6 种黄酒酒曲中细菌物种丰富度均远高于真菌。实验样品中细菌和真菌的文库覆盖率都比较高,这表明本次测序结果基本能够代表样品的实际情况。

2.4 不同酒曲微生物的群落结构分析

2.4.1 细菌群落结构分析 在门水平上 6 种酒曲共检测出 15 个细菌门,由图 3a 可知,其中丰度最高 10 种分别为厚壁菌门(Firmicutes)、变形杆菌门(Proteobacteria)、放线菌门(Actinobacteria)、蓝细菌门(Cyanobacteria)、拟杆菌门(Bacteroidetes)、疣微菌门(Verrucomicrobia)、盐厌氧菌门(Halanaerobiacota)、软壁菌门(Tenericutes)、芽单胞菌门(Gemmatimonadetes)、酸杆菌门(Acidobacteria)。如图 3a 所示,不仅相对丰度较高并且 6 种酒曲中均有分布的为厚壁菌门、变形杆菌门、放线菌门。不同酒曲之间其微生物菌群也有显著的不同,其中 JQ2, JQ3, JQ4, JQ6 的第一优势细菌门为厚壁菌门,丰度分别为 32.65%, 40.46%, 68.46%, 48.22%; 变形杆菌门是 JQ2, JQ3, JQ4, JQ6 的第二优势细菌门,占样品序列的 28.52%, 16.75%, 14.01%, 18.33%。而 JQ1, JQ5 的第一优势细菌门为变形杆菌门,丰度分别为 46.89%, 51.88%; 厚壁菌门是他们的第二优势细菌门。放线菌门主要存在于 JQ1, JQ2, JQ4 中,丰度分别为 22.54%, 22.64%, 13.43%, 在 JQ6 中最少仅为 2.22%。蓝细菌门主要存在于 JQ3, JQ5 中,占样品序

列的 20.46%, 14.90%。不同酒曲之间其微生物群落组成不同,其中 JQ1, JQ2, JQ4 细菌微生物群落组成较为相似, JQ3, JQ5, JQ6 细菌微生物群落组成较为相似,但是他们的相对丰度存在着明显的差异。

在属水平上 6 种酒曲中的细菌属共检测到 247 种,如图 3b 所示,其中丰度最高 10 种分别为肠杆菌科未培养细菌属(uncultured_bacterium_f_Enterobacteriaceae)、乳酸杆菌属(*Lactobacillus*)、未培养叶绿体细菌属(uncultured_bacterium_o_Chloroplast)、葡萄球菌属(*Staphylococcus*)、克雷伯氏菌属(*Klebsiella*)、双歧杆菌属(*Bifidobacterium*)、芽孢杆菌属(*Bacillus*)、枝芽孢菌属(*Virgibacillus*)、糖多孢菌属(*Saccharopolyspora*)、不动细菌属(*Acinetobacter*)。每种酒曲的细菌属组成都存在着较大的差异,肠杆菌科未培养细菌属(uncultured_bacterium_f_Enterobacteriaceae)、乳酸杆菌属(*Lactobacillus*)是 6 种酒曲共有的细菌属,但其丰度有着很大的差异。JQ1 中主要细菌属的组成为肠杆菌科未培养细菌属(uncultured_bacterium_f_Enterobacteriaceae, 10.87%)、乳酸杆菌属(*Lactobacillus*, 20.86%)和克雷伯氏菌属(*Klebsiella*, 30.46%)。乳酸杆菌属(*Lactobacillus*)是 JQ1 样品中的优势菌属。在 JQ2 中,双歧杆菌属(*Bifidobacterium*)和肠杆菌科未培养细菌属(uncultured_bacterium_f_Enterobacteriaceae)为优势细菌属,含量分别为 19.31% 和 16.77%。未培养叶绿体细菌属(uncultured_bacterium_o_Chloroplast)是 JQ3、JQ5 中的主要细菌属,其丰度分别为 20.44%、14.90%。枝芽孢菌属(*Virgibacillus*)仅在 JQ4 中作为优势细菌属,占

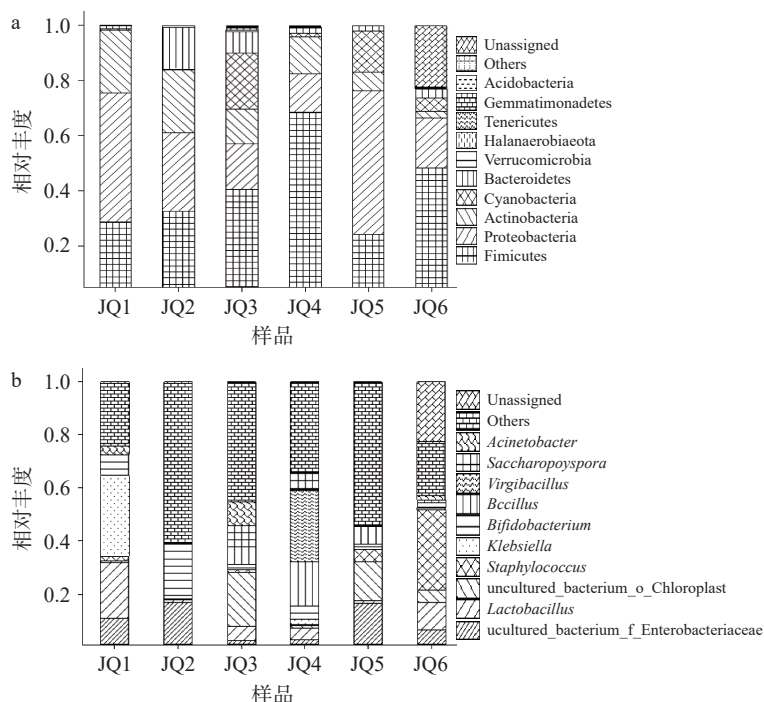


图 3 不同酒曲中主要细菌门和主要细菌属的分布

Fig.3 Changes in relative abundance of major bacterial phylum and major bacterial genus in different Koji

注: a.细菌门; b.细菌属。

样品序列的 27.04%。葡萄球菌属(*Staphylococcus*) 只在 JQ6 中丰度最大, 为 30.45%, 在其他酒曲中占比很少甚至可以忽略不计。

据报道, 酒曲中的细菌属有芽孢杆菌属、乳酸杆菌属、乳球菌属、链球菌属、芽孢梭菌属、葡萄球菌属、微细菌属、醋杆菌属等菌属^[27]。芽孢杆菌属可以产生淀粉酶以及蛋白酶, 在酿酒过程中有着及其重要作用, 能够降解淀粉、蛋白质等大分子物质^[28]。李艳等^[29]发现在羊羔大曲中乳酸杆菌属是其优势菌属, 其含量的高低影响着甜酒中酸味的轻重。刘芸雅^[30]等发现麦曲中优势菌属为芽孢杆菌属。郑亚伦等^[31]研究发现两种高温大曲细菌群落的优势菌属为克罗彭斯特菌属、糖多孢菌属、高温放线菌属、芽孢杆菌属、乳酸杆菌属和魏斯氏菌属。有相关文献报道大曲的主要优势微生物菌属为芽孢杆菌属、乳酸杆菌属、乳酸球菌属^[32-34]。上述优势细菌属与本研究的细菌属有部分重合。

2.4.2 细菌微生物群落相似性分析 由主坐标分析图 4a 可知, JQ1, JQ2 的距离较近, 群落差异较小; JQ4, JQ6 的距离较近, 群落差异较小; JQ5 距离其他 5 种酒曲的距离都较远, 差异较大为单独的一个组群。通过对样品细菌 Beta 多样性距离矩阵进行层级聚类分析, 构建样品层级聚类树研究不同样品的相似性和差异性^[35]。如图 4b, 6 种酒曲可分为 3 类, JQ1, JQ2 的细菌属聚为一类, JQ3, JQ4, JQ6 的细菌属聚为一类, JQ5 的细菌属单独为一类, Beta 分析结果与 PCoA 分析较为相似。

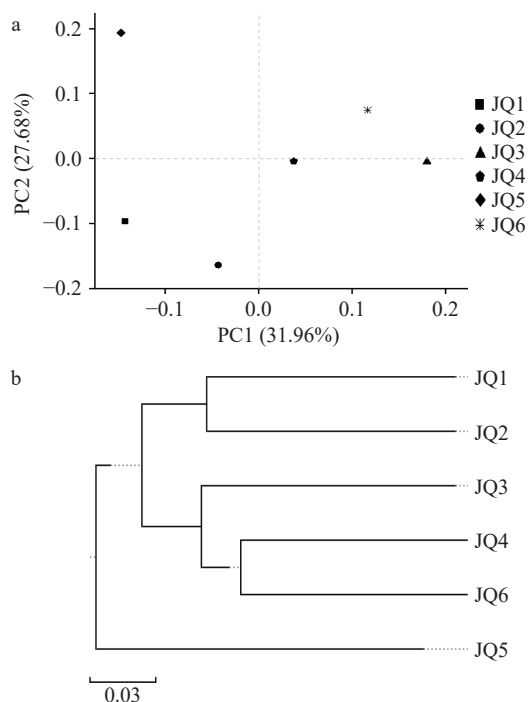


图 4 细菌相似性分析

Fig.4 Bacterial similarity analysis

注: a.主坐标分; b.基于 Beta 多样性距离的样品层级聚类树。

2.4.3 真菌群落结构分析 在门水平上, 6 种酒曲共

检测出 6 个真菌门, 由图 5a 可知分别为子囊菌门(Ascomycota)、毛霉门(Mucoromycota)、担子菌门(Basidiomycota)、被孢霉门(Mortierellomycota)、球囊菌门(Glomeromycota)、隐菌门(Rozellomycota)。在门水平上相对丰度高并且 6 种酒曲中都存在的真菌门为子囊菌门。不同酒曲样品之间其微生物群落组成也存在着差别。JQ1、JQ2、JQ3、JQ4 中 97.5% 以上都为子囊菌门, 其中 JQ1 中的丰度更是高达 99.9%。担子菌门是 JQ5 中的第二优势真菌门, 其丰度为 36.47%。毛霉门为 JQ6 中的第二优势真菌门, 占样品序列的 41.50%。

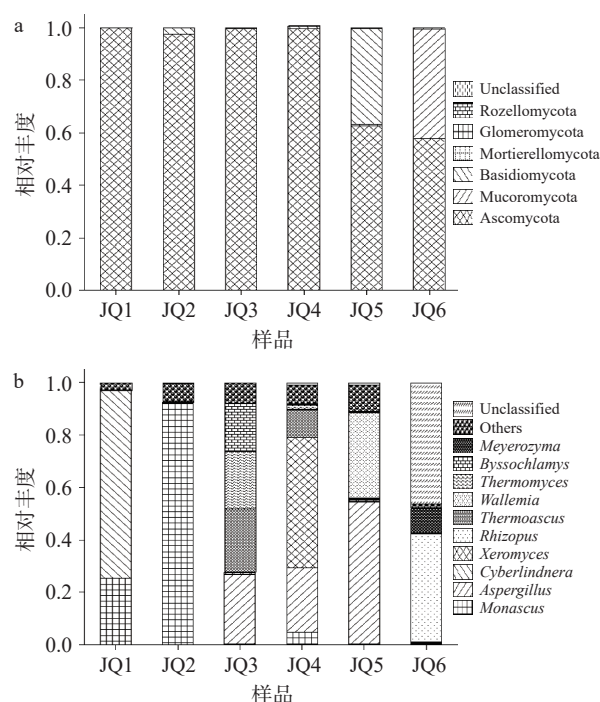


图 5 不同酒曲中主要真菌门和主要真菌属的分布

Fig.5 Changes in relative abundance of major fungi phylum and major fungi genus in different Koji

注: a.真菌门; b.真菌属。

在属水平上 6 种酒曲中的真菌属共检测到 93 种, 如图 5b 所示, 其中丰度最高 10 种分别红曲霉属(*monascus*)、曲霉属(*Aspergillus*)、塞伯林德纳氏酵母属(*Cyberlindnera*)、耐干霉菌属(*Xeromyces*)、米根霉菌属(*Rhizopus*)、热子囊菌属(*Thermoascus*)、节担菌属(*Wallemia*)、嗜热菌属(*Thermomyces*)、丝衣霉菌属(*Byssoschlamys*)、季也蒙迈耶氏酵母属(*Meyerozyma*); 由图 5b 可看出, 每种酒曲的真菌属组成都存在着较大的差异。JQ1 中第一、第二优势真菌属分别为塞伯林德纳氏酵母属和红曲霉属, 其丰度分别为 71.45% 及 25.38%。JQ2 的优势菌属为红曲霉属, 占样品序列的 92.03%。JQ3 的优势菌属是曲霉属、热子囊菌属、嗜热菌属、丝衣霉菌属, 丰度分别为 26.55%、24.09%、21.88%、18.45%。JQ4 的优势菌属是耐干霉菌属(19.67%), JQ5 的优势菌属是曲霉属(54.11%), 米根霉菌属(41.50%)是 JQ6

的优势菌属。

子囊菌门为绝对优势菌门,担子菌门与毛霉门是仅次于子囊菌门的优势菌门,这与凌梦莹的研究结果一致^[36]。王丹丹等^[37]发现孝感凤窝酒曲在门水平上子囊菌门为其主要真菌门,这与本研究子囊菌门是六种酒曲优势真菌门结果一致。孝感米酒的相关研究发现其优势真菌属是根霉属、曲霉属、酵母属^[18]。曲霉属等丝状真菌可在黄酒发酵过程中分泌 α -淀粉酶、 β -淀粉酶、糖化酶和蛋白酶等有利于淀粉糖化、蛋白质分解的酶类^[38]。据研究发现,红曲霉属可以代谢多种酶类并能促进底物分解^[39]。郑亚伦等研究发现两种高温大曲优势真菌属为热子囊菌属、嗜热真菌属和曲霉属等^[31]。

2.4.4 真菌微生物群落相似性分析 如图 6a 所示,真菌 NMDS 结果与细菌存在着差异,JQ1、JQ2 距离较近,同在第四象限,二者群落差异较小。JQ3、JQ4、JQ5 三者距离较近,同在中下部,它们之间的群落差异较小。JQ6 在第一象限右上方,距离其他五个点都比较远,存在着较大的差异,其单独为一个组群;由图 6b 可知,6 种酒曲可分为 3 类,JQ1、JQ2 的真菌属聚为一类,JQ3、JQ4、JQ5 的细菌属聚为一类,JQ6 的细菌属单独为一类,Beta 分析结果与 NMDS 分析结果一致。

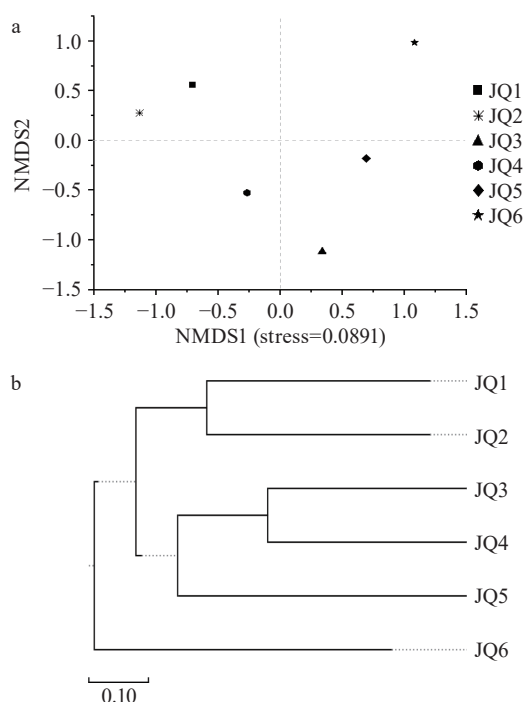


图 6 真菌相似性分析

Fig.6 Fungi similarity analysis

注: a.非度量多维尺度分析图; b.基于 Beta 多样性距离的样品层级聚类树。

3 结论

利用高通量测序技术对 6 种不同酒曲的微生物群落以及物种多样性之间的差异进行分析,从 6 种酒曲中共检测出 15 个细菌门和 6 个真菌门;247 个

细菌属和 93 个真菌属。酒曲中含有丰富的微生物群落,不同酒曲尽管其有着相似的微生物群落结构,但是他们的丰度仍然有着明显差异。6 种酒曲中,JQ1、JQ2 的细菌种群和真菌种群都相似,JQ3、JQ4、JQ6 的细菌种群较为相似,JQ3、JQ4、JQ5 的真菌群落比较相似,这体现了酒曲中微生物组成种类的复杂程度。微生物的多种代谢产物对酒的品质、口感都有着非常重要的作用,本研究通过对 6 种不同酒曲的微生物群落结构进行研究,为后续黄酒发酵最优酒曲的选择提供了理论参考。

参考文献

- [1] YANG Y J, XIA Y J, WANG G Q, et al. Effect of mixed yeast starter on volatile flavor compounds in Chinese rice wine during different brewing stages[J]. *LWT*, 2017, 78: 373–381.
- [2] 傅金泉. 中国黄酒古今谈[J]. *酿酒科技*, 2011(5): 113–116. [FU Jinquan. Introduction to yellow rice wine in China from ancient time to present day[J]. *Liquor-Making Science & Technology*, 2011(5): 113–116.]
- [3] 杨佳, 李新生, 耿敬章, 等. 黄酒中氨基甲酸乙酯的研究进展[J]. *中国酿造*, 2020, 39(3): 7–11. [YANG Jia, LI Xinsheng, GENG Jingzhang, et al. Research progress on ethyl carbamate of Huangjiu[J]. *China Brewing*, 2020, 39(3): 7–11.]
- [4] LIU R, FU Z K, ZHANG F J, et al. Effect of yellow rice wine on anti-aging ability in aged mice induced by d-galactose[J]. *Food Science and Human Wellness*, 2020, 9(2): 184–191.
- [5] REN Q, SUN L P, SUN Z B, et al. Bacterial succession and the dynamics of flavor compounds in the Huangjiu fermented from corn[J]. *Archives of Microbiology*, 2020, 202(2): 299–308.
- [6] LIU S P, MAO J, LIU Y Y, et al. Bacterial succession and the dynamics of volatile compounds during the fermentation of Chinese rice wine from Shaoxing region[J]. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 2015, 31(12): 1907–1921.
- [7] ZHU F B, LI S, GUAN X, et al. Influence of vacuum soaking on the brewing properties of japonica rice and the quality of Chinese rice wine[J]. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2020, 130(2): 159–165.
- [8] JIAO A Q, XU X M, JIN Z Y. Research progress on the brewing techniques of new-type rice wine[J]. *Food Chemistry*, 2017, 215: 508–515.
- [9] 李杰, 许彬, 罗建成, 等. 红小米黄酒酿造工艺研究及体外抗氧化活性评价[J]. *中国酿造*, 2021, 40(7): 123–129. [LI Jie, XU Bin, LUO Jiancheng, et al. Brewing technology and *in vitro* antioxidant activity evaluation of red-millet huangjiu[J]. *China Brewing*, 2021, 40(7): 123–129.]
- [10] 鞠乐, 强学杰, 牛银亭, 等. 南阳地区谷子产业现状及发展对策的研究与探讨[J]. *大麦与谷类科学*, 2017, 34(3): 45–47.
- [11] JU Le, QIANG Xuejie, NIU Yinting, et al. The present status of millet industry in Nanyang region and proposed strategies for its development[J]. *Barley and Cereal Sciences*, 2017, 34(3): 45–47.]
- [12] CAO Y, XIE G F, WU C, et al. A study on characteristic flavor compounds in traditional Chinese Rice Wine-Guyue Longshan Rice Wine[J]. *Journal of the Institute of Brewing*, 2010, 116(2): 182–189.

- [12] CHEN C, LIU Y, TIAN H X, et al. Metagenomic analysis reveals the impact of Jiuyao microbial diversity on fermentation and the volatile profile of Shaoxing-jiu[J]. Food Microbiology, 2020, 86: 103–326.
- [13] 唐鰻秋, 夏珣, 覃凤阳, 等. 四川黄酒麦曲发酵过程中理化特性及微生物多样性变化研究[J]. 食品与发酵工业, 2021, 47(24): 35–40. [TANG Manqiu, XIA Yu, QIN Fengyang, et al. Physicochemical characteristics and microbial diversity in wheat Qu serving for Sichuan Huangjiu during fermentation[J]. Food and Fermentation Industries, 2021, 47(24): 35–40.]
- [14] 李永翔, 蒋海娇, 郭建华. 基于高通量测序分析玉米黄酒微生物多样性[J]. 齐齐哈尔大学学报(自然科学版), 2021, 37(3): 62–65. [LI Yongxiang, JIANG Haijiao, GUO Jianhua. Analysis of microbial diversity of corn rice wine based on high-throughput sequencing[J]. Journal of QiQiHaEr University (Natural Science Edition), 2021, 37(3): 62–65.]
- [15] 牡丹, 解修超, 李新生, 等. 黄酒酒曲微生物及其代谢产物的研究进展[J]. 生物资源, 2019, 41(2): 104–111. [DU Dan, XIE Chaoxiu, LI Xinsheng, et al. Research progress on microorganisms and their metabolites of Huangjiu Qu[J]. Biotic Resources, 2019, 41(2): 104–111.]
- [16] 牡丹, 解修超, 邓百万, 等. 谢村黄酒酒曲微生物多样性分析及产 γ -氨基丁酸能力的初步研究[J]. 食品与发酵工业, 2019, 45(19): 144–150. [DU Dan, XIE Xiuchao, DENG Baiwan, et al. Microbial diversity and γ -aminobutyric acid production ability of Xie Cun Huangjiu wheat Qu[J]. Food and Fermentation Industries, 2019, 45(19): 144–150.]
- [17] 沈馨, 尚雪娇, 董蕴, 等. 基于 MiSeq 高通量测序技术对3个孝感凤窝酒曲细菌多样性的评价[J]. 中国微生态学杂志, 2018, 30(5): 525–530. [SHEN Xin, SHANG Xuejiao, DONG Yun, et al. The diversity of 3 bacterial strains in the koji of Xiaogan Fengwo rice wine by MiSeq high throughput sequencing[J]. Chinese Journal of Microecology, 2018, 30(5): 525–530.]
- [18] CAI H Y, ZHANG T, ZHANG Q, et al. Microbial diversity and chemical analysis of the starters used in traditional Chinese sweet rice wine[J]. Food Microbiology, 2018, 73: 319–326.
- [19] 朱小芳, 张凤杰, 俞剑葵, 等. 黄酒浸米水中细菌群落结构及优势菌代谢分析[J]. 食品科学, 2017, 38(10): 82–86. [ZHU Xiaofang, ZHANG Fengjie, YU Jianshen, et al. Analysis of microbial community structure and metabolic characteristics of dominant microbes in rice milk for yellow wine[J]. Food Science, 2017, 38(10): 82–86.]
- [20] TANG J, TANG X X, TANG M, et al. Analysis of the bacterial communities in two liquors of soy sauce aroma as revealed by High-Throughput Sequencing of the 16S rRNA V4 Hypervariable Region[J]. Biomed Research International, 2017, 2017: 1–9.
- [21] 李伟程, 侯强川, 于洁, 等. 传统发酵乳制品中微生物多样性研究[J]. 食品工业科技, 2018, 39(1): 131–136. [LI Weicheng, HOU Qiangchuan, YU Jie, et al. Study on the diversity of microbial in traditional fermented dairy products[J]. Science and Technology of Food Industry, 2018, 39(1): 131–136.]
- [22] 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(8): 534–536. [ZHAO Kai, XUE Pengju, GU Guangye. Study on determination of reducing sugar content using 3, 5-dinitrosalicylic acid method[J]. Food Science, 2008(8): 534–536.]
- [23] 油卉丹. 不同种类大米黄酒酿造的差异性研究[D]. 无锡: 江南大学, 2017: 56. [YOU Huidan. Characterization of the difference among Chinese rice wine brewed from different varieties of rice[D]. Wuxi: Jiangnan University, 2017: 56.]
- [24] DUARTE W F, DIAS D R, OLIVEIRA J M, et al. Raspberry (*Rubus idaeus* L.) wine: Yeast selection, sensory evaluation and instrumental analysis of volatile and other compounds[J]. Food Research International, 2010, 43(9): 2303–2314.
- [25] 周蒙, 颜振敏, 程娇娇, 等. 响应面优化发酵型山药米酒的工艺[J]. 食品研究与开发, 2017, 38(12): 71–76. [ZHOU Meng, YAN Zhenmin, CHENG Jiaojiao, et al. Optimization of yam rice wine fermentation process using response surface methodology[J]. Food Research and Development, 2017, 38(12): 71–76.]
- [26] 牟穰. 清爽型黄酒酿造微生物群落结构及其与风味物质相关性研究[D]. 无锡: 江南大学, 2015. [MU Rang. Analysis of the microbial community structure and the correlation with flavor substances during qingshuang type Chinese rice wine brewing[D]. Wuxi: Jiangnan University, 2015.]
- [27] MITTER E K, FREITAS J R, GERMIDA J J. Bacterial root microbiome of plants growing in oil sands reclamation covers[J]. Frontiers in Microbiology, 2017: 8.
- [28] 母应春, 姜丽, 苏伟. 应用 Illumina 高通量测序技术分析3种酒曲中微生物多样性[J]. 食品科学, 2019, 40(14): 115–122. [MU Yingchun, JIANG Li, SU Wei. Analysis of microbial diversity in three rice wine kojis by illumina high-throughput sequencing[J]. Food Science, 2019, 40(14): 115–122.]
- [29] 李艳, 董振玲, 牟德华. 羊羔美酒大曲中酵母菌多样性及分子鉴定[J]. 食品科学, 2014, 35(5): 144–149. [LI Yan, DONG Zhenling, MOU Dehua. Diversity and molecular biological identification of yeast strains from Yanggaomeiji liquor fermentation starter (Daqu)[J]. Food Science, 2014, 35(5): 144–149.]
- [30] 刘芸雅, 毛健, 孟祥勇, 等. 绍兴黄酒麦曲及发酵过程中细菌群落结构分析[J]. 中国食品学报, 2017, 17(1): 201–208. [LIU Yunya, MAO Jian, MENG Xiangyong, et al. Exploring bacterial community in wheat qu and their changes during Shaoxing rice wine fermentation[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2017, 17(1): 201–208.]
- [31] 郑亚伦, 赵婷, 王家胜, 等. 数字化高温大曲发酵过程中微生物群落结构的变化[J]. 食品科学: 1–14[2022-06-06]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.2206.TS.20210913.1001.014.html>. [ZHENG Yalun, ZHAO Ting, WANG Jiasheng, et al. Changes in the microbial community structure during the digitally managed fermentation of high-temperature Daqu[J]. Food Science: 1–14[2022-06-06]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.2206.TS.20210913.1001.014.html>.]
- [32] WANG P, WU Q, JIANG X, et al. Bacillus licheniformis affects the microbial community and metabolic profile in the spontaneous fermentation of Daqu starter for Chinese liquor making[J]. International Journal of Food Microbiology, 2017, 250: 59–67.
- [33] LI H, HUANG J, LIU X P, et al. Characterization of in-

terphase microbial community in Luzhou-Flavored Liquor manufacturing pits of various ages by polyphasic detection methods[J]. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2017, 27(1): 130–140.

[34] YAO J, D Y, L M A. Correlation between volatile profiles and microbial communities[J]. *Food Research International*, 2019, 121: 422–432.

[35] 唐凯, 贾丽娟, 高晓丹, 等. 浑善达克沙地生物土壤结皮及其下层土壤中好氧不产氧光营养细菌群落结构及多样性[J]. *微生物学报*, 2018, 58(2): 228–237. [TANG Kai, JIA Lijuan, GAO Xiaodan, et al. Community structure and diversity of aerobic anoxygenic phototrophic bacteria in soil crusts and subsoil of Hunshandake deserts[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2018, 58(2): 228–237.]

[36] 凌梦荧. 绍兴黄酒麦曲的关键指标筛选及品质评价方法研究[D]. 无锡: 江南大学, 2019. [LING Mengying. Study on the key indicators screening and quality evaluation method of Shaoxing Huangjiu wheat Qu[D]. Wuxi: Jiangnan University, 2019.]

[37] 王丹丹, 沈馨, 董蕴, 等. 孝感凤窝酒曲真菌多样性评价[J]. *中国酿造*, 2017, 36(11): 38–42. [WANG Dandan, SHEN Xin, DONG Yun, et al. Evaluation of fungal diversity in Xiaogan Fengwo rice wine koji[J]. *China Brewing*, 2017, 36(11): 38–42.]

[38] 于南京, 俞存根, 许永久, 等. 舟山群岛外海域虾类群落结构及其与环境因子的关系[J]. *中国水产科学*, 2021, 28(3): 288–298. [YU Nanjing, YU Cungen, XU Yongjiu, et al. Shrimp community structure and its relationship with environmental factors in the offshore waters of Zhoushan Islands[J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2021, 28(3): 288–298.]

[39] 代文婷, 吴宏, 郭安民, 等. 红曲霉在酿酒行业中的应用研究进展[J]. *食品与发酵工业*, 2018, 44(1): 280–284. [DAI Wenting, WU Hong, GUO Anmin, et al. The research progress in the wine industry of *Monascus*[J]. *Food and Fermentation Industries*, 2018, 44(1): 280–284.]