

龙树瑞, 葛东颖, 蔡文超, 等. 长治地区清香型大曲理化特性与细菌类群的关联性分析 [J]. 食品工业科技, 2023, 44(17): 115–120.
doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2022080264

LONG Shuchang, GE Dongying, CAI Wenchao, et al. Correlation Analysis between Physicochemical Characteristics and Bacterial Taxa of Fen-flavor Daqu in Changzhi Area[J]. Science and Technology of Food Industry, 2023, 44(17): 115–120. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2022080264

· 生物工程 ·

长治地区清香型大曲理化特性与细菌类群的关联性分析

龙树瑞^{1,2}, 葛东颖^{1,2}, 蔡文超^{1,2}, 刘忠军^{2,3}, 宋子赞⁴, 郭千璋⁴, 郭 壮^{1,2,*}

(1.湖北文理学院湖北省食品配料工程技术研究中心, 湖北襄阳 441053;

2.襄阳市酿酒生物技术与应用企校联合创新中心, 湖北襄阳 441053;

3.清香型白酒生物技术襄阳市重点实验室, 湖北襄阳 441053;

4.山西老雄山酒业有限公司, 山西长治 047100)

摘 要:采用理化分析和 MiSeq 高通量测序相结合的方法, 对山西省长治地区 11 个清香型大曲的理化特性和细菌类群进行了解析, 并对两者的相关性进行了揭示。理化分析发现, 不同清香型大曲样品在氨基酸态氮、液化力和酒化力等指标上变异系数均大于 15% 存在较大的差异, 其中不同样品在液化力上的差异最大, 在灰分上的差异最小。MiSeq 高通量测序分析发现, 在所有样品中均存在且平均相对含量>1.0% 的细菌属分别为水杆菌属 (*Aquabacterium*)、嗜糖假单胞菌属 (*Pelomonas*)、芽孢杆菌属 (*Bacillus*)、雷尔氏菌属 (*Ralstonia*)、鞘脂单胞菌属 (*Sphingomonas*)、伯克氏菌属 (*Burkholderia*)、甲基杆菌属 (*Methylobacterium*) 和慢生根瘤菌属 (*Bradyrhizobium*), 且不同样品共有大量的细菌类群。经相关性分析发现, *Sphingomonas* 与蛋白质含量呈显著正相关 ($P<0.05$), 而与酸度呈显著负相关 ($P<0.05$), *Ralstonia* 与水分活度和酯化力均呈显著正相关 ($P<0.05$), *Pelomonas* 和 *Aquabacterium* 与水分活度均呈显著正相关 ($P<0.05$)。由此可见, 不同清香型大曲间存在大量共有细菌类群, 且细菌类群与酒曲的部分理化特性存在一定相关性。

关键词: 长治, 清香型大曲, 理化特性, 细菌类群

中图分类号: TS261.1

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2023)17-0115-06

DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2022080264



本文网刊:

Correlation Analysis between Physicochemical Characteristics and Bacterial Taxa of Fen-flavor Daqu in Changzhi Area

LONG Shuchang^{1,2}, GE Dongying^{1,2}, CAI Wenchao^{1,2}, LIU Zhongjun^{2,3},
SONG Ziyun⁴, GUO Qianzhang⁴, GUO Zhuang^{1,2,*}

(1.Hubei Provincial Engineering and Technology Research Center for Food Ingredients, Hubei University of Arts and Science, Xiangyang 441053, China;

2.Xiangyang Liquor Brewing Biotechnology and Application Enterprise-University Joint Innovation Center, Xiangyang 441053, China;

3.Xiangyang Fen-flavor Baijiu Biotechnology Key Laboratory, Xiangyang 441053, China;

4.Shanxi Laoxiongshan Wine Industry Co., Ltd., Changzhi 047100, China)

Abstract: In this study, the physicochemical characteristics and bacterial taxa of 11 fen-flavor Daqu samples from Changzhi, Shanxi Province were analyzed using a combination of physicochemical analysis and MiSeq high-throughput sequencing, and the correlation between them was revealed. The physicochemical analysis showed that the variation

收稿日期: 2022-08-24

基金项目: 湖北文理学院教师科研能力培育基金“科技创新团队”(2020kypyt009); 湖北文理学院科研启动基金(kyqdf2021014)。

作者简介: 龙树瑞(2002-), 男, 本科, 研究方向: 食品生物技术, E-mail: 2081192084@qq.com。

* 通信作者: 郭壮(1984-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 食品生物技术, E-mail: guozhuang1984@163.com。

coefficients of amino acid nitrogen, liquefaction power and alcoholization power of different fen-flavor Daqu samples were greater than 15%, with the largest difference in liquefaction power and the smallest difference in ash. MiSeq high-throughput sequencing analysis found that the bacterial genera presented in all samples with an average relative content >1.0% were *Aquabacterium*, *Pelomonas*, *Bacillus*, *Ralstonia*, *Sphingomonas*, *Burkholderia*, *Methylobacterium* and *Bradyrhizobium*, and a large number of bacterial taxa were shared among the different samples. Correlation analysis revealed that *Sphingomonas* showed a significant positive correlation with protein content ($P<0.05$) and a significant negative correlation with acidity ($P<0.05$), *Ralstonia* showed a significant positive correlation with both water activity and esterification power ($P<0.05$), and *Pelomonas* and *Aquabacterium* both showed a significant positive correlation with water activity ($P<0.05$). It is evident that there are a large number of shared bacterial taxa among the different fen-flavor Daqu, and there is a correlation between bacterial taxa and some physicochemical properties of Daqu.

Key words: Changzhi; fen-flavor Daqu; physicochemical properties; bacterial taxa

由于酿造时使用的酒曲类型不同,清香型白酒通常分为大曲清香、小曲清香和麸曲清香,其中大曲清香型白酒选用以大麦和豌豆制成的大曲为糖化发酵剂,在 3 类酒曲酿造的白酒中具有最佳的品质^[1]。清香型大曲蕴含丰富的微生物类群和酶系,在白酒酿造过程中提供了酒体风味和风味的前体物质^[2],大曲品质好坏对酒体的优劣具有较大影响,因而具有“曲乃酒之骨”的说法,如何提升清香型大曲的品质是酿酒行业科研人员比较关心的问题。具有丰富经验的科研人员,通常从外观、断面、曲皮厚和曲香等维度对大曲进行感官鉴评^[3],结合大曲液化力、发酵力、酯化力、糖化力和酒化力的理化分析结果,对大曲品质进行综合评价^[4]。清香型大曲的微生物类群亦与其品质存在较大的关联性,Hou 等^[5]研究发现清香型大曲中糖多孢菌属(*Saccharopolyspora*)与糖化力呈显著负相关,而黄单胞菌属(*Xanthomonas*)与发酵力和酯化力呈显著正相关,可见解析不同微生物与理化性质的关联性对提升清香型大曲的品质具有一定积极作用。

Illumina Miseq 测序技术在清香型大曲细菌类群的解析中被广泛地应用^[6]。周森等^[7]对北京、山西、台湾、黑龙江和河北等地的清香型大曲微生物类群进行研究,结果发现不同地区出产的大曲中乳酸菌和芽孢杆菌数量之间存在较大差异且不具有规律性,因而对不同地区清香型大曲中特有微生物类群进行解析和甄别,对于清香型白酒品质的提升具有积极的作用。清香型白酒以汾酒为代表,长治市有许多企业从事清香型大曲和白酒的制作和酿造,然而目前关于长治地区清香型大曲理化特性与细菌类群关联性研究的报道尚少。

本研究对山西长治地区清香型大曲的理化指标进行测定,采用 Illumina Miseq 测序技术对其细菌类群进行解析,在此基础上揭示清香型大曲理化指标与细菌类群的相关性,为清香型大曲微生物类群的解析和品质提升提供数据支持和理论支撑。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

清香型大曲 采集于山西省长治市长治县(东

经 113°02'19"~113°09'51",北纬 35°52'45"~35°57'00"之间),随机采取同一批次生产的 11 个样品,记为 LXS1~LXS11。样品采集时所有的大曲均在库房储藏了 3 个月左右,以大麦和豌豆为原料制作而成,属于青茬清香型大曲,制曲温度为 40~50 ℃;PCA 培养基 青岛海博生物技术有限公司;引物 338F/806R 武汉天一辉远生物科技有限公司;Illumina MiSeq 测序配套试剂 美国 Illumina 公司。

K9860 全自动凯氏定氮仪 中国海能公司;HE53 型水分测定仪 梅特勒-托利多国际贸易(上海)有限公司;VSA 动态水蒸汽吸附分析仪 美国 AquaLAB 公司;MiSeq PE250 高通量测序平台 美国 Illumina 公司;R930 机架式服务器 美国 Dell 公司。

1.2 实验方法

1.2.1 清香型大曲理化指标的检测 清香型大曲的酸度、氨基酸态氮、灰分、水分、淀粉、液化力、发酵力、酯化力、糖化力和酒化力均参照轻工行业标准 QB/T 4257-2011《酿酒大曲通用分析方法》进行测定;蛋白质含量参照 GB/T 5009.5-2010《食品中蛋白质的测定》中的凯氏定氮法进行测定;水分活度采用水分活度仪进行测定。

1.2.2 清香型大曲细菌 Illumina MiSeq 测序 使用试剂盒提取清香型大曲中微生物的基因组 DNA^[8],以 338F/806R 为引物进行 PCR 扩增^[9],扩增产物由上海美吉生物医药科技有限公司完成高通量测序。

1.2.3 生物信息学分析 去除返回序列中的核苷酸标签与引物,参照王玉荣等^[10]的方法对序列进行质控,使用 QIIME(V1.9.1)分析平台^[11]进行 PyNAST 校准并对齐序列^[12],根据 97% 相似度进行分类操作单元(Operational taxonomic units, OTU)的划分^[13]。使用 ChimeraSlayer 检查剔除含嵌合体的 OTU^[14],通过与 Greengenes 数据库比对明确各分类学地位^[15]。

1.3 数据处理

使用 Graph Pad Prism9 软件绘制样品各理化指标的小提琴图;使用 R 软件(v4.1.2)的“reshape2”和“ggplot2”包绘制气泡图、“UpSetR”包绘制 Upset 图和“waterfall”包绘制瀑布图;使用 Cytoscape 软件(v3.7.2)绘制相关性网络图。

2 结果与分析

2.1 长治地区清香型大曲理化指标分析

大曲理化性质可以反映自身的属性和发酵特性。本研究采用理化分析方法,对长治地区 11 个清香型大曲样品的水分活度、酸度、氨基酸态氮、灰分、水分、蛋白质和淀粉的含量进行分析,结果如图 1 所示。

由图 1 可知,11 个清香型大曲水分活度的范围为 0.561~0.690,变异系数为 8.29%;酸度的范围在 0.4~0.7 mmol/10 g,变异系数为 13.09%;氨基酸态氮的含量范围为 2.46~4.40 g/kg,变异系数为 17.58%;灰分的含量范围为 2.91%~3.19%,变异系数为 2.54%;水分的含量范围为 9.4%~12.3%,变异系数为 8.83%;蛋白质的含量范围为 15.601%~18.107%,变异系数为 4.78%;淀粉的含量范围为 51.5%~54.1%,变异系数为 1.60%。由于氨基酸态氮的变异系数大于 15%,表明纳入本研究的 11 个清香型大曲在氨基酸态氮上存在较大的差异。氨基酸态氮是大曲生香力的重要指标,Zhao 等^[16]的研究表明,*Bacillus* 是参与白酒发酵的主要功能性细菌,该属的细菌可分泌淀粉酶和蛋白酶等水解酶,这些水解酶将淀粉和蛋白质等大分子转化为葡萄糖和氨基酸,进而产生各种风味前体物质,有助于白酒风味的形成,而酸度的形成主要来自产酸微生物的有机酸代谢以及脂肪、淀粉和蛋白质的降解^[17]。由此推测,纳入本研究的清香型大曲在氨基酸态氮和酸度上存在明显差异的原因,可能与其蕴含的微生物类群有关。

大曲的酶活性亦是反映大曲品质的重要生化指标,进一步对清香型大曲的液化力、发酵力、酯化力、糖化力和酒化力进行了测定,结果如图 2 所示。

由图 2 可知,纳入本研究的 11 个清香型大曲样品的液化力范围在 1.78~3.20 U/g,变异系数为 18.84%;发酵力范围在 6.47~11.21 U/g,变异系数为 14.34%;酯化力范围在 555~825 U/g,变异系数为 11.55%;糖化力范围在 810~954 U/g,变异系数为 5.99%;酒化力范围在 3.6~7.4 vol,变异系数为 17.47%。虽然纳

入本研究的 11 个清香型大曲在液化力和酒化力上存在较为明显的差异,但其酶活均符合大曲的质量标准^[18]。Wu 等^[19]的研究表明随着大曲中芽孢杆菌含量的增加,其液化力显著提高,Tang 等^[20]的研究发现除了酵母菌与大曲的酒化力密切相关外,*Saccharopolyspora*、高温放线菌属(*Thermoactinomyces*)和戊糖片球菌属(*Pediococcus*)等细菌与酒化力亦呈正相关。由此可见,清香型大曲的细菌菌群组成与其酶活力可能也存在一定的关联性。

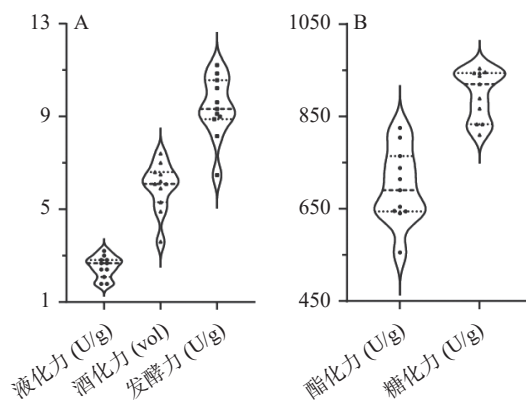


图 2 清香型大曲的酶活性

Fig.2 Enzymatic activity of fen-flavor Daqu

2.2 长治地区清香型大曲的测序信息及 α 多样性分析

对清香型大曲的细菌总数进行了计数,细菌总数的范围为 7.06~7.46 lg CFU/g。采用 Illumina MiSeq 高通量测序技术对 11 个清香型大曲的细菌类群结构进行了解析,整理测序结果如表 1 所示。

由表 1 可知,通过质控后共获得 369653 条高质量序列,平均每个样品 33604 条序列,经 97% 的相似性划分后共获得 11933 个 OTU,比对所有序列后共划分为 22 个门、48 个纲、85 个目、160 个科和 277 个属,其中鉴定不到门和属的序列仅有 0.22% 和 7.73%。通过 α 多样性分析可知,在 11 个清香型大曲中样品 LXS7 的超 1 指数最大,而样品 LXS8 的香农指数最大,这表明样品 LXS7 的细菌类群丰度更高,而样品 LXS8 的细菌类群多样性更高,产生这

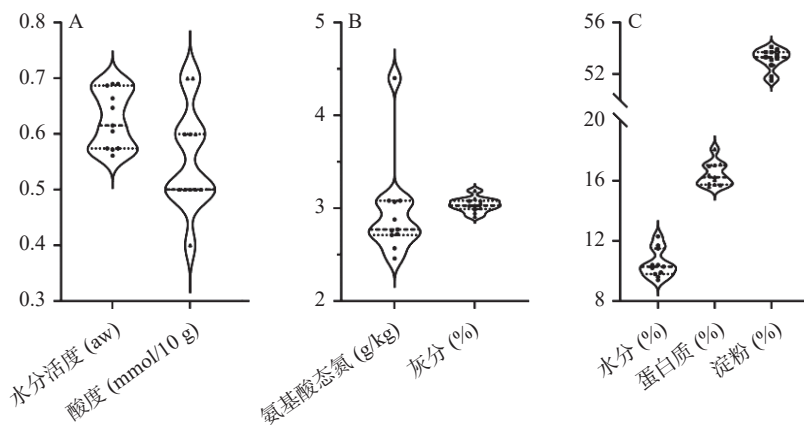


图 1 清香型大曲的理化指标

Fig.1 Physicochemical indexes of fen-flavor Daqu

表 1 清香型大曲测序结果及各分类地位数量

Table 1 Sequencing results and the number of each taxonomic classification of fen-flavor Daqu

编号	序列数(条)	OTU数(个)	门(个)	纲(个)	目(个)	科(个)	属(个)	超1指数	香农指数
LXS1	32039	1014	9	22	38	67	89	1440	5.14
LXS2	40056	1251	12	26	40	72	99	1630	5.85
LXS3	39309	916	10	21	37	64	88	1162	4.42
LXS4	30513	1057	15	28	40	73	93	1528	5.82
LXS5	30530	1063	12	21	37	63	90	1523	5.77
LXS6	34672	1038	11	25	39	65	93	1487	5.82
LXS7	33862	1148	9	22	33	63	84	1726	5.86
LXS8	33595	1203	10	27	46	86	101	1677	6.04
LXS9	32148	1148	7	20	32	56	77	1627	5.78
LXS10	30349	1068	9	19	29	56	77	1660	5.72
LXS11	32580	1027	10	20	32	53	75	1526	5.65

注: 超1指数和香农指数均在测序量为29010条序列时计算所得。

种现象的原因可能是在踩曲等环节的人工接种或环境中微生物的自然接种等方面使得不同样品在微生物组成和含量上存在些许差异。

2.3 长治地区清香型大曲细菌类群的解析

将在 11 个清香型大曲中均存在、平均相对含量大于 1.0% 的细菌门、属和 OTU 定位为核心优势细菌门、属和 OTU, 绘制核心优势细菌门和属的气泡图如图 3 所示。

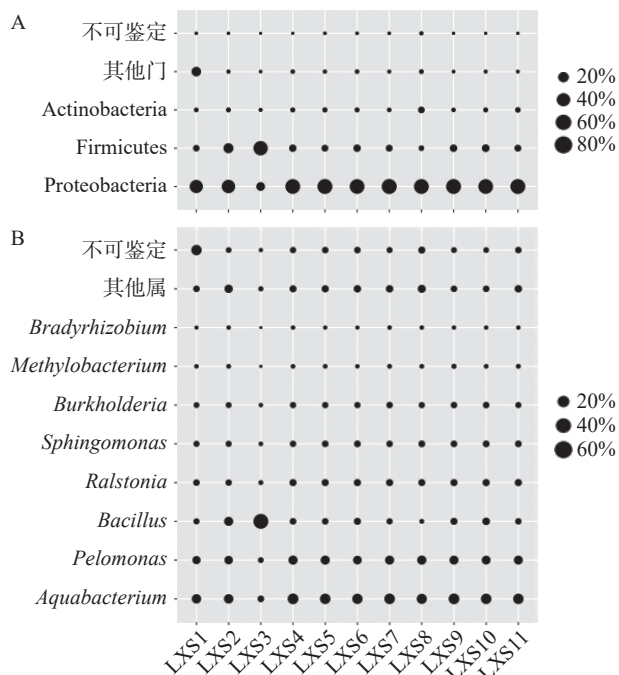


图 3 清香型大曲中核心优势细菌门(A)和属(B)的气泡图
Fig.3 Bubble diagram of core dominant bacteria phylum (A) and genus (B) in fen-flavor Daqu

由图 3 可知, 清香型大曲中 3 个核心优势细菌门为变形菌门(Proteobacteria, 76.07%)、厚壁菌门(Firmicutes, 17.81%)和放线菌门(Actinobacteria, 2.64%), 8 个核心优势细菌属为水杆菌属(Aquabacterium, 27.30%)、嗜糖假单胞菌属(Pelomonas, 17.56%)、芽孢杆菌属(Bacillus, 14.77%)、雷尔氏菌属(Ralstonia, 8.20%)、鞘脂单胞菌属(Sphingomonas, 6.52%)、伯克氏菌属(Burkholderia, 5.47%)、甲基杆

菌属(Methylobacterium, 1.77%)和慢生根瘤菌属(B Bradyrhizobium, 1.14%)。Cai 等^[21]亦采用高通量测序的方法对采集自湖北省襄阳市的 30 个清香型大曲的细菌类群进行了解析, 结果发现优势细菌属为 Bacillus(54.26%)、链霉菌属(Streptomyces, 11.47%)、Saccharopolyspora(11.34%)、乳酸杆菌属(Lactobacillus, 6.56%)和 Thermoactinomyces(1.53%)。虽然两个地区的清香型大曲微生物类群具有较大区别, 但 Bacillus 均为两个地区的共有优势细菌属。因能产生芽孢且具有牢固的抗逆性和环境适应性, Bacillus 在发酵过程中通过美拉德反应代谢产生的游离氨基酸增加了白酒独特的香味, 是参与白酒酿造的主要功能性细菌^[4]。清香型白酒品质讲究“一清到底”, 然而本研究发现大曲中除含有 Bacillus 外, 亦含有大量 Aquabacterium 和 Pelomonas, 复杂的细菌类群是否会对清香型白酒的“清”这一品质产生影响值得深入研究。Xia 等^[22]的研究表明隶属于 Aquabacterium 的细菌可以产生葡聚糖分支酶并参与微生物的厌氧消化过程, 这可能有助于白酒发酵系统中的碳循环, 但其对白酒品质的影响尚需进一步研究揭示。He 等^[23]的研究表明人工接种贝莱斯芽孢杆菌(Bacillus velezensis)和枯草芽孢杆菌(Bacillus subtilis)后增加了大曲中细菌特别是乳酸菌的含量, 并且大曲的液化力、糖化力和酯化力亦有显著提高。在踩曲等环节人工强化接种 Bacillus, 对提高清香型大曲的品质可能具有积极意义。

进一步对 OTU 在各样品中的分布及核心优势 OTU 进行了分析, 结果如图 4 所示。

由图 4 可知, 在 11 个清香型大曲中均存在的 OTU 有 278 个, 包含的序列数为 297348 条, 占质控合格序列的 80.44%, 而其中核心优势 OTU 仅有 11 个, 分别为隶属于 Bacillus 的 OTU337、OTU4056 和 OTU7205, 隶属于 Aquabacterium 的 OTU6251 和 OTU6311, 隶属于 Pelomonas 的 OTU2807, 隶属于 Ralstonia 的 OTU5368, 隶属于 Sphingomonas 的 OTU361, 隶属于 Burkholderia 的 OTU894, 隶属于 Bradyrhizobium 的 OTU2556 和隶属于 Methylobac-

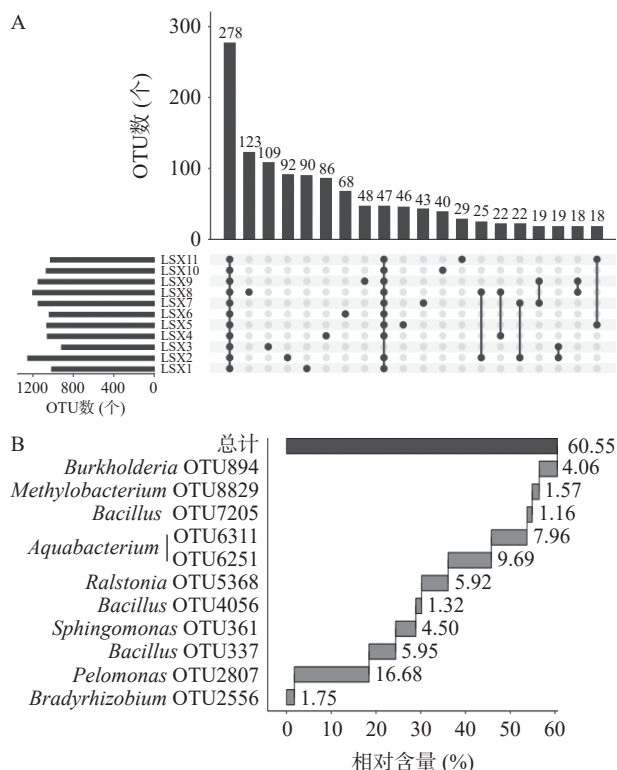


图 4 基于 OTU 的 Upset 分析(A)与核心优势 OTU 的瀑布图(B)

Fig.4 Upset analysis based on OTU (A) and waterfall diagram of core advantage OTU (B)

terium 的 OTU8829。由此可见, 纳入本研究的样品中存在大量的共有细菌类群, 且主要由 *Bacillus*、*Aquabacterium*、*Pelomonas*、*Ralstonia*、*Sphingomonas*、*Burkholderia*、*Bradyrhizobium* 和 *Methylobacterium* 组成。

2.4 长治地区清香型大曲理化特性和细菌类群的相关性分析

在对清香型大曲理化指标和微生物类群进行测试和解析的基础上, 进一步对两者的相关性进行研究, 两者相关性的网络图如图 5 所示。

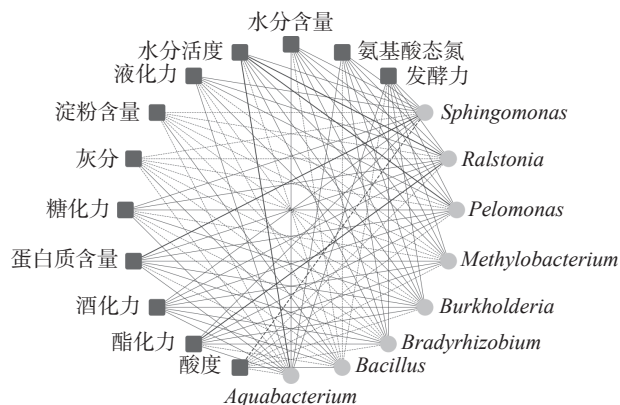


图 5 清香型大曲中核心优势细菌属与理化性质的相关性网络图

Fig.5 Correlation network diagram of core dominant bacterial genera and physicochemical properties in fen-flavor Daqu
注: 实线代表正相关, 虚线代表负相关; 加粗线段代表 $P < 0.05$ 。

由图 5 可知, 清香型大曲中核心优势细菌属与各理化指标之间存在 63 个正相关和 33 个负相关, 但仅 6 组指标间的相关性具有统计学意义 ($P < 0.05$), 其中 *Sphingomonas* 与蛋白质含量呈显著正相关 ($P < 0.05$), 而与酸度呈显著负相关 ($P < 0.05$), *Ralstonia* 与水分活度和酯化力均呈显著正相关 ($P < 0.05$), *Pelomonas* 和 *Aquabacterium* 与水分活度均呈显著正相关 ($P < 0.05$)。 *Sphingomonas* 作为白酒发酵过程中的稀有微生物, Zhang 等^[24] 的研究发现其通常来源于原料和酿造环境中的空气, 与白酒中丁二酸二乙酯和己酸乙酯等香气物质呈正相关。 Xu 等^[25] 的研究表明 *Ralstonia* 可以利用 H_2O 、 CO_2 和甲酸生成异丁醇, 异丁醇等某些醇类是白酒中芳香和后味的过渡桥梁。

3 结论

虽然长治地区清香型大曲样品间存在大量隶属于 *Aquabacterium*、*Pelomonas*、*Bacillus*、*Ralstonia*、*Sphingomonas*、*Burkholderia*、*Methylobacterium* 和 *Bradyrhizobium* 等的共有细菌类群, 但不同样品在氨基酸态氮、液化力和酒化力上存在较大的差异, 并且 *Sphingomonas* 与蛋白质含量呈显著正相关且与酸度呈显著负相关 ($P < 0.05$), *Ralstonia* 与水分活度和酯化力均呈显著正相关, *Pelomonas* 和 *Aquabacterium* 与水分活度均呈显著正相关 ($P < 0.05$), 后续研究中进一步揭示这些菌群与酒曲品质的共变性, 对提升清香型大曲的品质可能具有积极意义。

参考文献

- [1] 王震, 叶宏, 朱婷婷, 等. 清香型白酒风味成分的研究进展[J]. 食品科学, 2022, 43(7): 232-244. [WANG Z, YE H, ZHU T T, et al. Progress in research on the flavor components of light-flavor Baijiu[J]. Food Science, 2022, 43(7): 232-244.]
- [2] 梁春光, 郝建国, 江伟, 等. 不同工艺清香型大曲理化指标差异与微生物菌群结构的相关性研究[J]. 酿酒, 2021, 48(2): 43-48. [LUAN C G, HAO J G, JIANG W, et al. The correlational study between the phys-chemical index and the microbiota in fen flavor starter (Daqu)[J]. Liquor Making, 2021, 48(2): 43-48.]
- [3] ZHENG J, ZHAO D, PENG Z, et al. Variation of aroma profile in fermentation process of Wuliangye baobaoqu starter[J]. Food Research International, 2018, 114(12): 64-71.
- [4] DENG L, MAO X, LIU D, et al. Comparative analysis of physicochemical properties and microbial composition in high-temperature Daqu with different colors[J]. Frontiers in Microbiology, 2020, 11(11): 588117.
- [5] HOU Q, WANG Y, CAI W, et al. Metagenomic and physicochemical analyses reveal microbial community and functional differences between three types of low-temperature Daqu[J]. Food Research International, 2022, 156(6): 111167.
- [6] ZUO Q, HUANG Y. Evaluation of bacterial diversity during fermentation process: A comparison between handmade and machine-made high-temperature Daqu of Maotai-flavor liquor[J]. *Annals of Microbiology*, 2020, 70(1): 1-10.
- [7] 周森, 胡佳音, 崔洋, 等. 应用高通量测序技术解析清香型大曲微生物多样性[J]. 中国食品学报, 2019, 19(6): 244-250. [ZHOU S, HU J Y, CUI Y, et al. Microbial diversity analysis of

- flight-flavor Daqu using high-throughput sequencing[J]. *Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology*, 2019, 19(6): 244–250.]
- [8] CAI W, WANG Y, HOU Q, et al. Rice varieties affect bacterial diversity, flavor, and metabolites of Zha-chili[J]. *Food Research International*, 2021, 147(9): 110556.
- [9] GUO Z, WANG Y, XIANG F, et al. Evaluating the flavor and divergent bacterial communities in corn-based zha-chili[J]. *Food Bioscience*, 2022, 46(4): 101563.
- [10] 王玉荣, 杨成聪, 葛东颖, 等. 扩增区域对鲜广椒细菌 MiSeq 测序的影响[J]. *食品科学*, 2019, 40(10): 134–140. [WANG Y R, YANG C C, GE D Y, et al. Influence of different amplification regions on results of bacterial diversity in Zhaguangjiao, a Chinese traditional fermented chili product, by MiSeq sequencing[J]. *Food Science*, 2019, 40(10): 134–140.]
- [11] LÓPEZ-GARCÍA A, PINEDA-QUIROGA C, ATXAERANDIO R, et al. Comparison of Mothur and QIIME for the analysis of rumen microbiota composition based on 16S rRNA amplicon sequences[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2018, 9(12): 3010.
- [12] CAPORASO J G, BITTINGER K, BUSHMAN F D, et al. PyNAST: A flexible tool for aligning sequences to a template alignment[J]. *Bioinformatics*, 2010, 26(2): 266–267.
- [13] EDGAR R C. Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST[J]. *Bioinformatics*, 2010, 26(19): 2460–2461.
- [14] HAAS B J, GEVERS D, EARL A M, et al. Chimeric 16S rRNA sequence formation and detection in Sanger and 454-pyrosequenced PCR amplicons[J]. *Genome Research*, 2011, 21(3): 494–504.
- [15] CAN M. Annotation of bacteria by Greengenes classifier using 16S rRNA gene hyper variable regions[J]. *Southeast Europe Journal of Soft Computing*, 2019, 8(2): 35–45.
- [16] ZHAO X, LIU Y, SHU L, et al. Study on metabolites of *Bacillus* producing soy sauce-like aroma in Jiang-flavor Chinese spirits[J]. *Food Science & Nutrition*, 2020, 8(1): 97–103.
- [17] FAN G, SUN B, FU Z, et al. Analysis of physicochemical indices, volatile flavor components, and microbial community of a light-flavor Daqu[J]. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, 2018, 76(3): 209–218.
- [18] 沈才洪, 张良, 应鸿, 等. 大曲质量标准体系设置的探讨[J]. *酿酒科技*, 2005, 26(11): 8–13. [SHEN C H, ZHANG L, YING H, et al. Study on Daqu quality standards(V)-investigation[J]. *Liquor-Making Science & Technology*, 2005, 26(11): 8–13.]
- [19] WU X, JIANG Q, WANG Z, et al. Diversity, enzyme production and antibacterial activity of *Bacillus* strains isolated from sesame-flavored liquor Daqu[J]. *Archives of Microbiology*, 2021, 203(9): 5831–5839.
- [20] TANG J, CHEN J, CHEN D, et al. Structural characteristics and formation mechanism of microbiota related to fermentation ability and alcohol production ability in Nongxiang Daqu[J]. *Foods*, 2022, 11(17): 2602.
- [21] CAI W, WANG Y, NI H, et al. Diversity of microbiota, microbial functions, and flavor in different types of low-temperature Daqu[J]. *Food Research International*, 2021, 150(12): 110734.
- [22] XIA C Y, QIAO Y, DONG C N, et al. Enzymatic properties of an efficient glucan branching enzyme and its potential application in starch modification[J]. *Protein Expression and Purification*, 2021, 178(2): 105779.
- [23] HE G, DONG Y, HUANG J, et al. Alteration of microbial community for improving flavor character of Daqu by inoculation with *Bacillus velezensis* and *Bacillus subtilis*[J]. *LWT*, 2019, 111(8): 1–8.
- [24] ZHANG H, WANG L, WANG H, et al. Effects of initial temperature on microbial community succession rate and volatile flavors during Baijiu fermentation process[J]. *Food Research International*, 2021, 141(3): 109887.
- [25] XU J, WU H, WANG Z, et al. Microbial dynamics and metabolite changes in Chinese rice wine fermentation from sorghum with different tannin content[J]. *Scientific Reports*, 2018, 8(1): 1–11.