

## 研究报告

## 配糟对清香型白酒发酵中环境因子及微生物群落的影响

唐洁, 阮松, 林斌, 陈前锦, 杜栋, 夏金阳, 江威, 杨生智, 杨强, 陈申习\*

劲牌有限公司劲牌研究院 中药保健食品质量与安全湖北省重点实验室, 湖北 黄石 435100

唐洁, 阮松, 林斌, 陈前锦, 杜栋, 夏金阳, 江威, 杨生智, 杨强, 陈申习. 配糟对清香型白酒发酵中环境因子及微生物群落的影响[J]. 微生物学通报, 2024, 51(2): 554-572.

TANG Jie, RUAN Song, LIN Bin, CHEN Qianjin, DU Dong, XIA Jinyang, JIANG Wei, YANG Shengzhi, YANG Qiang, CHEN Shenxi. Effects of distilled grains on environmental factors and microbial communities in the fermentation of light flavor Baijiu[J]. Microbiology China, 2024, 51(2): 554-572.

**摘要:** 【背景】环境因子是影响微生物生长代谢的重要因素, 解析半开放条件下酿造过程中环境因子对微生物群落演替的作用对于清香型白酒生产调控具有重要意义。配糟在白酒发酵过程中起着调节发酵速度的作用, 其对微生物群落组成变化的影响尚不明确。【目的】揭示使用不同发酵周期配糟对清香型白酒发酵过程中环境因子及微生物群落演替的影响。【方法】采用 PacBio 测序平台和多元统计分析比较使用 2 种配糟酒醅中微生物群落结构组成, 结合蒙特卡洛置换检验明确环境因子对微生物群落的影响。【结果】与使用正常发酵周期配糟酒醅相比, 使用延长发酵周期配糟酒醅水分较低, 而酸度、氨基酸态氮、总游离氨基酸、还原糖和残余淀粉较高; 微生物多样性和丰富度分析发现, 使用延长发酵周期配糟酒醅中细菌  $\alpha$  多样性极显著高于使用正常发酵周期配糟酒醅( $P<0.001$ ), 而真菌  $\alpha$  多样性显著/极显著低于使用正常发酵周期配糟酒醅( $P<0.05$ ,  $P<0.001$ ); 通过组间差异性分析发现, 细菌群落共产生 28 个差异指示种, 而真菌群落共产生 15 个差异指示种; 水分、酸度、氨基酸态氮、还原糖、残余淀粉和总游离氨基酸对微生物群落结构的影响显著( $P<0.05$ ), 其中水分、酸度、氨基酸态氮和总游离氨基酸与使用延长发酵周期配糟酒醅微生物群落密切相关, 还原糖和残余淀粉是使用正常发酵周期配糟酒醅微生物群落演替的主要驱动因素。【结论】本研究揭示了使用不同发酵周期配糟的清香型白酒发酵过程中环境因子对微生物群落组装的驱动作用, 为清香型白酒的可控发酵提供了理论基础。

**关键词:** 清香型白酒; 配糟; 环境因子; 高通量测序; 微生物群落

资助项目: 湖北省自然科学基金(2022CFB137)

This work was supported by the Natural Science Foundation of Hubei Province (2022CFB137).

\*Corresponding author. E-mail: chenshenxi2006@163.com

Received: 2023-07-10; Accepted: 2023-08-23; Published online: 2023-09-19

# Effects of distilled grains on environmental factors and microbial communities in the fermentation of light flavor *Baijiu*

TANG Jie, RUAN Song, LIN Bin, CHEN Qianjin, DU Dong, XIA Jinyang, JIANG Wei, YANG Shengzhi, YANG Qiang, CHEN Shenxi\*

Hubei Provincial Key Laboratory for Quality and Safety of Traditional Chinese Medicine Health Food, Jing Brand Research Institute, Jing Brand Limited Company, Huangshi 435100, Hubei, China

**Abstract:** [Background] Environmental factors affect the microbial growth and metabolism. Therefore, understanding their influences on microbial community succession in the semi-open fermentation process is of great significance for the production regulation of light flavor *Baijiu*. Distilled grains play a role in regulating the fermentation speed of *Baijiu*, while their effects on microbial community succession are still unclear. [Objective] To reveal the effects of distilled grains fermented for different time periods on the environmental factors and microbial community succession during light flavor *Baijiu* fermentation. [Methods] The high-throughput sequencing on PacBio platform and multivariate statistical analysis were performed to reveal the microbial community structures in two different groups of fermented grains. Monte Carlo permutation tests were conducted to determine the effects of environmental factors on microorganisms. [Results] The fermented grains prepared with distilled grains produced in extended fermentation period (EG) had lower water content and higher acidity, amino acid nitrogen, total free amino acids, reducing sugar, and residual starch than those prepared with distilled grains produced in normal fermentation period (NG). The fermented grains with EG had higher bacterial alpha diversity ( $P<0.001$ ) and lower fungal alpha diversity than those with NG ( $P<0.05$ ,  $P<0.001$ ). A total of 28 differential bacterial indicator species and 15 differential fungal indicator species between groups were identified. Water content, acidity, amino acid nitrogen, reducing sugar, residual starch, and total free amino acids had effects on the microbial community structure ( $P<0.05$ ). Among them, water content, acidity, amino acid nitrogen, and total free amino acids were associated with the microbial community of fermented grains with EG, and reducing sugar and residual starch were the main driving factors for the microbial community succession of fermented grains with NG. [Conclusion] The effects of environmental factors on microbial community assembly in the fermentation process of light flavor *Baijiu* with distilled grains produced in different fermentation periods were revealed, laying a foundation for the controlled brewing of light flavor *Baijiu*.

**Keywords:** light flavor *Baijiu*; distilled grains; environmental factors; high-throughput sequencing; microbial community

清香型作为中国白酒三大基本香型之一,其质量评价主要取决于感官指标和核心有益化合物的种类和含量,这些化合物与酿造过程中的微生物群落结构及其代谢活动有关<sup>[1]</sup>。白酒酿造过程中微生物群落结构和代谢受到环境因子(水分、酸度、还原糖和底物等)的强烈影响,它们不仅影响酿酒微生物的正常生长和繁殖,还影响各种香气物质的形成,进而影响白酒的感官特征<sup>[2-3]</sup>。因此,探究清香型白酒发酵过程中酒醅环境因子的变化规律及其调控酿造微生物代谢作用机制,可为解析中国白酒发酵微生物机制提供理论依据,有助于更好地提升清香型白酒品质。

清香型白酒具有清香淡雅、酒体柔和及回甜醇净的风格特征,而形成这些风味特征的原因之一在于其传承创新运用了先糖化后发酵、清蒸清烧和续糟配料生产工艺<sup>[4]</sup>。续糟配料工艺是酿造中将上一轮发酵蒸馏后的酒醅作为配糟,与本轮酒曲糖化后的高粱按一定比例混合后入池发酵的过程。由于配糟具有营养物质丰富、含水量高和酸度高等特征,在清香型白酒生产中可以用来调节发酵醅的水分、酸度、淀粉浓度和发酵醅的疏松度等<sup>[5-6]</sup>,因此配糟质量对清香型白酒的发酵具有重要的影响。前期文献报道延长发酵周期有助于促进白酒品质,主要体现在白酒中风味物质的含量有所提升<sup>[7-8]</sup>,但目前鲜有文献报道使用不同发酵周期配糟对清香型白酒酿造微生物群落的影响。

本研究以清香型白酒为载体,探究使用不同发酵周期配糟对清香型白酒发酵酒醅中环境因子以及微生物群落结构演替和多样性的影响。利用 PacBio 测序平台对使用不同发酵周期配糟清香型白酒发酵酒醅中微生物群落变化进行分析,结合酒醅环境因子的变化,采用多元统计分析(偏最小二乘判别分析、相关性分析和

蒙特卡洛置换检验),明确不同发酵周期配糟对清香型白酒发酵酒醅微生物多样性的影响,以及环境因子对酿造过程微生物群落结构演替的推动作用,以期对清香型白酒微生物酿造机理的解析提供参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 样品

酒醅样品于 2022 年 7 月取自某有限公司,糯高粱经糖化后按粮糟重量配比 1:1.5 混合后入池发酵 15 d。其中使用的配糟分别为正常发酵周期 15 d 和延长发酵周期 25 d 蒸馏后的酒醅。样品从 3 个不同的发酵槽车(1.62 m×1.0 m×1.48 m)中采集得到,在中间层采用五点取样法混合成一个混合样品,于发酵的 0、1、2、3、4、5、7、9、11 和 14 d 取样(使用正常发酵周期配糟酒醅样品标记为 NG0、NG1、NG2、NG3、NG4、NG5、NG7、NG9、NG11 和 NG14,使用延长发酵周期配糟酒醅样品标记为 EG0、EG1、EG2、EG3、EG4、EG5、EG7、EG9、EG11 和 EG14),每个时间点采集 3 个不同槽车酒醅作为平行样本,共计 60 份样本。样品采集后立即运回实验室分成 3 份进行贮存:第 1 份储存在 4 °C 用于酵母菌和乳酸菌活菌计数;第 2 份储存在-20 °C 用于酒醅样品的理化指标检测;第 3 份储存在-80 °C 用于基因组 DNA 提取。

#### 1.1.2 培养基和主要试剂、仪器

MRS 培养基和孟加拉红培养基,青岛海博生物技术有限公司。所有试剂均为分析纯,国药(集团)上海化学试剂有限公司;TGuide S96 磁珠法土壤/粪便基因组 DNA 提取试剂盒,天根生化科技(北京)有限公司;KOD FX Neo 和 KOD One™ PCR Master Mix,北京百灵克生物科技有限责任公司;SMRTbell Template Prep Kit

建库试剂盒, PacBio 公司。PacBio Sequel II 测序仪, PacBio 公司; synergy HTX 酶标仪, 安捷伦科技(中国)有限公司; 氨基酸全自动分析仪, 赛卡姆(北京)科学仪器有限公司。

## 1.2 方法

### 1.2.1 酒醅发酵过程可培养酵母菌和乳酸菌菌落计数

在无菌条件下, 称取 10 g 酒醅于 90 mL 无菌水中, 150 r/min 振荡 30 min 后进行梯度稀释。其中酵母菌计数选取  $10^{-3}$ 、 $10^{-4}$  梯度稀释悬液 0.2 mL 均匀涂布于孟加拉红培养基中。乳酸菌计数采用倾注倒平板法, 先取  $10^{-3}$ 、 $10^{-4}$  梯度稀释悬液 0.2 mL 于培养皿中, 再加入 MRS 培养基进行混匀。每个梯度设置 2 个平行, 涂布和混匀完后将酵母和乳酸菌培养皿分别置于 30 °C 和 37 °C 恒温培养箱中倒置培养 48–72 h, 样品中不同微生物总数依据菌落数在 30–300 的平板统计平均结果乘以稀释倍数算出。

### 1.2.2 酒醅理化指标的测定

酒醅理化性质的测定见参考文献[9–11]: 采用烘干法测定水分含量; 采用滴定法测定酒醅的酸度和氨基酸态氮; 采用 3,5-二硝基水杨酸 (3,5-dinitrosalicylic acid, DNS) 法测定酒醅样品的还原糖含量; 采用酸水解结合斐林试剂法测定淀粉含量。酒醅中的游离氨基酸采用氨基酸全自动分析仪按 GB5009.124—2016<sup>[12]</sup> 方法测定。

### 1.2.3 酒醅 DNA 提取和高通量测序

采用 16S rRNA 基因和内源转录间隔区 (internal transcribed spacer, ITS) 序列三代全长测序对酒醅中微生物群落进行分析, 基本流程包括: 样品 DNA 提取与检测、PCR 全长扩增与产物纯化、PCR 产物定量与均一化、构建 SMRT Bell 文库和 PacBio 上机测序。根据 TGuide S96 磁珠法土壤/粪便基因组 DNA 提取试剂盒的操作规程提取酒醅样品中的 DNA。对

于细菌进行 16S rRNA 基因全长扩增, 引物为 16S-F (5'-AGRGTGTTGATYNTGGCTCAG-3') 和 16S-R (5'-TASGGHTACCTTGTTASGACTT-3')。PCR 反应体系: 模板 DNA (15 ng/ $\mu$ L) 2  $\mu$ L, 正、反向引物 (5  $\mu$ mol/L) 各 1  $\mu$ L, BSA 溶液 (2 ng/ $\mu$ L) 3  $\mu$ L, 2 $\times$ Taq Plus Master Mix 12.5  $\mu$ L, ddH<sub>2</sub>O 补足 25  $\mu$ L。PCR 反应条件: 94 °C 5 min; 94 °C 30 s, 50 °C 30 s, 72 °C 60 s, 共 30 个循环; 72 °C 10 min; 4 °C 保存。对于真菌进行 ITS 全长扩增, 引物为 ITS1F (5'-CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA-3') 和 ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3')。PCR 反应体系除引物不同外, 其余与细菌 PCR 反应体系一致。PCR 反应条件: 94 °C 5 min; 94 °C 30 s, 55 °C 30 s, 72 °C 60 s, 共 28 个循环; 72 °C 10 min, 4 °C 保存。PCR 产物经纯化、定量和均一化形成测序文库, 建好的文库经过质检合格后最终在 PacBio Sequel II 测序仪上测序。

### 1.2.4 序列处理

原始数据下机后经过 SMRT Link v8.0 软件校正后得到 circular consensus sequencing (CCS) 序列, 先后使用 LimA v1.7.0、CUTADAPT1.9.1 和 UCHIME v4.2 软件分别对 CCS 序列进行识别、过滤和去除嵌合体, 得到有效 CCS 序列。利用 USEARCH 软件根据 97% 的序列相似度将有效 CCS 序列划分成不同的操作分类单元 (operational taxonomic unit, OTU), 基于 OTU 代表序列与对应数据库中序列比对结果, 明确所获取 OTU 的系统发育学信息。文中所有测序获得的原始序列已上传至 NCBI 的 sequence read archive (SRA) 数据库中, 登录号为 PRJNA1010519。利用 QIIME2 对样品的  $\alpha$  多样性指数进行评估, 其中常用的 Shannon 指数和 Simpson 指数兼顾群落均匀度, 而 Chao1 指数和 ACE 指数侧重于体现群落丰富度<sup>[13]</sup>。

### 1.2.5 数据处理

数据经过 Excel 和 SPSS Statistics 19.0 软件进行统计分析,采用单因素方差分析中的 Duncan 检验比较组间和组内的显著性差异;折线图、箱床图和柱状图采用 Origin 2018 进行绘制;使用 R 语言工具制作稀释曲线图和 Venn 图;linear discriminant analysis Effect Size (LEfSe)利用 Python LEfSe 包绘制;偏最小二乘判别分析(partial least squares-discriminant analysis, PLS-DA)采用 SIMCA14.1 软件进行分析;利用 R 的 Vegan 软件包进行冗余分析(redundancy analysis, RDA),以揭示发酵酒醅环境因子与对微生物群落的影响,并进行蒙特卡洛置换检验<sup>[14]</sup>;酒醅发酵过程中微生物和环境因子相关性矩阵利用 R 绘制。

## 2 结果与分析

### 2.1 配糟理化性质分析

由表 1 可见,相较于正常发酵周期配糟(NG),延长发酵周期配糟(EG)水分含量、酸度、氨基酸态氮和总游离氨基酸含量均较高,而还原糖和残余淀粉均较低。其中延长发酵周期配糟的酸度、氨基酸态氮和总游离氨基酸含量分别比正常发酵周期配糟显著性增加 16.67%、20.51% 和 30.45%,还原糖和残余淀粉分别显著性降低 24.56%和 18.23%。

### 2.2 可培养酵母菌和乳酸菌的变化规律

由图 1A 可知,使用正常发酵周期配糟(NG)和延长发酵周期配糟(EG)酒醅发酵过程中酵母总数整体变化规律一致,均表现为先上升后下降,但使用正常发酵周期配糟酒醅中酵母总数在发酵 2 d 时酵母数量最高,而使用延长发酵周期配糟酒醅酵母总数在发酵 3 d 时达到峰值,且发酵前 4 天使用 NG 配糟酒醅酵母数量高于使用 EG 配糟酒醅,但发酵 4 d 后使用 EG 配糟酒醅酵母总数高于使用 NG 配糟酒醅。如图 1B 所示,乳酸菌总数在发酵过程中变化趋势比较平缓,数量级在  $10^6$  CFU/g 酒醅,但均在发酵结束时有所上升,且使用 NG 配糟酒醅中乳酸菌数量高于使用 EG 配糟酒醅。

### 2.3 酒醅发酵过程中环境因子变化情况

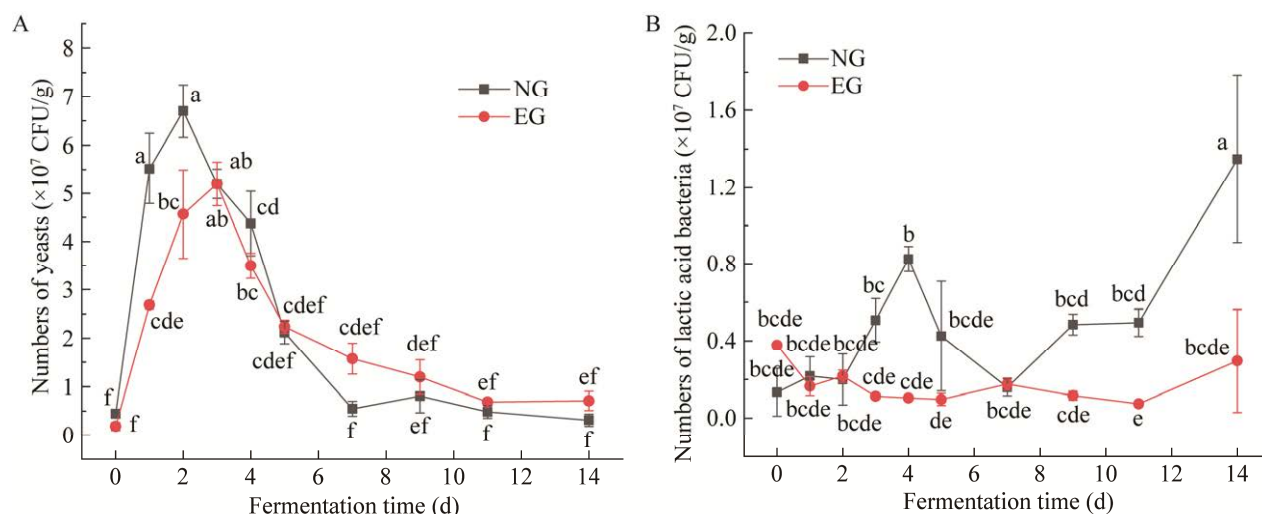
为探究导致 2 种配糟酒醅条件下微生物群落组成差异的原因,考察酒醅发酵过程中可能会引起微生物生长代谢改变的环境因子,包括水分、酸度、氨基酸态氮、还原糖、残余淀粉和游离氨基酸。如图 2 所示,酒醅中水分发酵前期快速上升,发酵中后期变化平缓,且使用 NG 配糟酒醅水分高于使用 EG 配糟酒醅;酒醅中酸度在发酵 0–2 d 下降,使用 NG 配糟酒醅酸度发酵 2 d 后波动上升,而使用 EG 配糟酒醅发酵 2 d 后变化无显著性差异,且使用 EG 配糟

表 1 正常发酵周期和延长发酵周期配糟的理化性质

Table 1 Physicochemical properties of normal fermentation period distilled grains (NG) and extended fermentation period distilled grains (EG)

Variables	Normal fermentation period distilled grains (NG)	Extended fermentation period distilled grains (EG)	<i>P</i>
Water content (%)	68.20±0.52	69.15±0.33	0.06
Acidity (mmol/10 g)	0.60±0.01	0.70±0.03	0.01*
Amino acid nitrogen (g/kg)	0.39±0.01	0.47±0.01	0.00***
Total free amino acids (%)	20.26±1.09	26.43±0.79	0.00***
Reducing sugar (%)	0.57±0.06	0.43±0.06	0.05*
Residual starch (%)	6.09±0.26	4.98±0.14	0.01*

\*:  $P<0.05$ ; \*\*:  $P<0.01$ ; \*\*\*:  $P<0.001$ .



**图1** 使用2种配糟发酵过程中可培养微生物的动态变化 A: 酵母数量. B: 乳酸菌数量. NG: 使用正常发酵周期配糟发酵的样品. EG: 使用延长发酵周期配糟发酵的样品. 不同小写字母表示具显著差异 ( $P<0.05$ ). 下同

Figure 1 Dynamic changes of cultivable microorganisms during the fermentation process using two types of fermented grains. A: Numbers of yeasts. B: Numbers of lactic acid bacteria. NG: Samples fermented using normal fermentation period distilled grains. EG: Samples fermented using extended fermentation period distilled grains. Different lowercase letters indicate significant differences at the 0.05 level. The same below.

酒醅酸度均要高于使用 NG 配糟酒醅; 酒醅中氨基酸态氮均是在发酵 0–2 d 快速下降, 随后上升, 发酵结束后均未达到起始值, 且使用 EG 配糟酒醅氨基酸态氮含量均高于使用 NG 配糟酒醅; 酒醅中总游离氨基酸在发酵过程中呈上升趋势, 发酵前 3 天快速增加, 随后变化平缓波动不大, 且均是使用 EG 配糟酒醅总游离氨基酸高于使用 NG 配糟酒醅; 还原糖和残余淀粉均是发酵前 3 天快速下降, 3 d 后变化平缓且无显著性差异, 且均是使用 EG 配糟酒醅还原糖和残余淀粉高于使用 NG 配糟酒醅。

## 2.4 酒醅发酵过程中微生物群落结构演替

### 2.4.1 样品测序深度评估及 OTU 聚类分析

使用 2 种发酵周期配糟发酵过程酒醅细菌样本测序共获得 1 227 577 条 CCS 序列, 平均产生 10 229 条序列, 97% 的相似水平聚类获得

601 个 OTU。真菌样本测序共获得 3 129 847 条 CCS 序列, 平均产生 26 082 条序列, 97% 的相似水平聚类获得 93 个 OTU。所有样本的稀释曲线(图 3)显示测序结果能够充分覆盖样品中微生物组成, 可用于后续分析。

### 2.4.2 Venn 图分析

如图 4A 所示, 使用 2 种配糟发酵起始和结束酒醅细菌共有 39 个 OTU, 使用 EG 配糟酒醅发酵 0 d 特有的 OTU 有 86 个, 发酵结束时特有的 OTU 数目是 22 个, 而使用 NG 配糟酒醅发酵 0 d 特有的 OTU 有 25 个, 发酵结束时特有的 OTU 数目是 33 个。真菌样品间共有 46 个 OTU, 使用 EG 配糟酒醅发酵 0 d 特有的 OTU 有 66 个, 发酵结束时特有的 OTU 数目是 21 个, 而使用 NG 配糟酒醅发酵 0 d 特有的 OTU 有 25 个, 发酵结束时特有的 OTU 数目是 32 个(图 4B)。

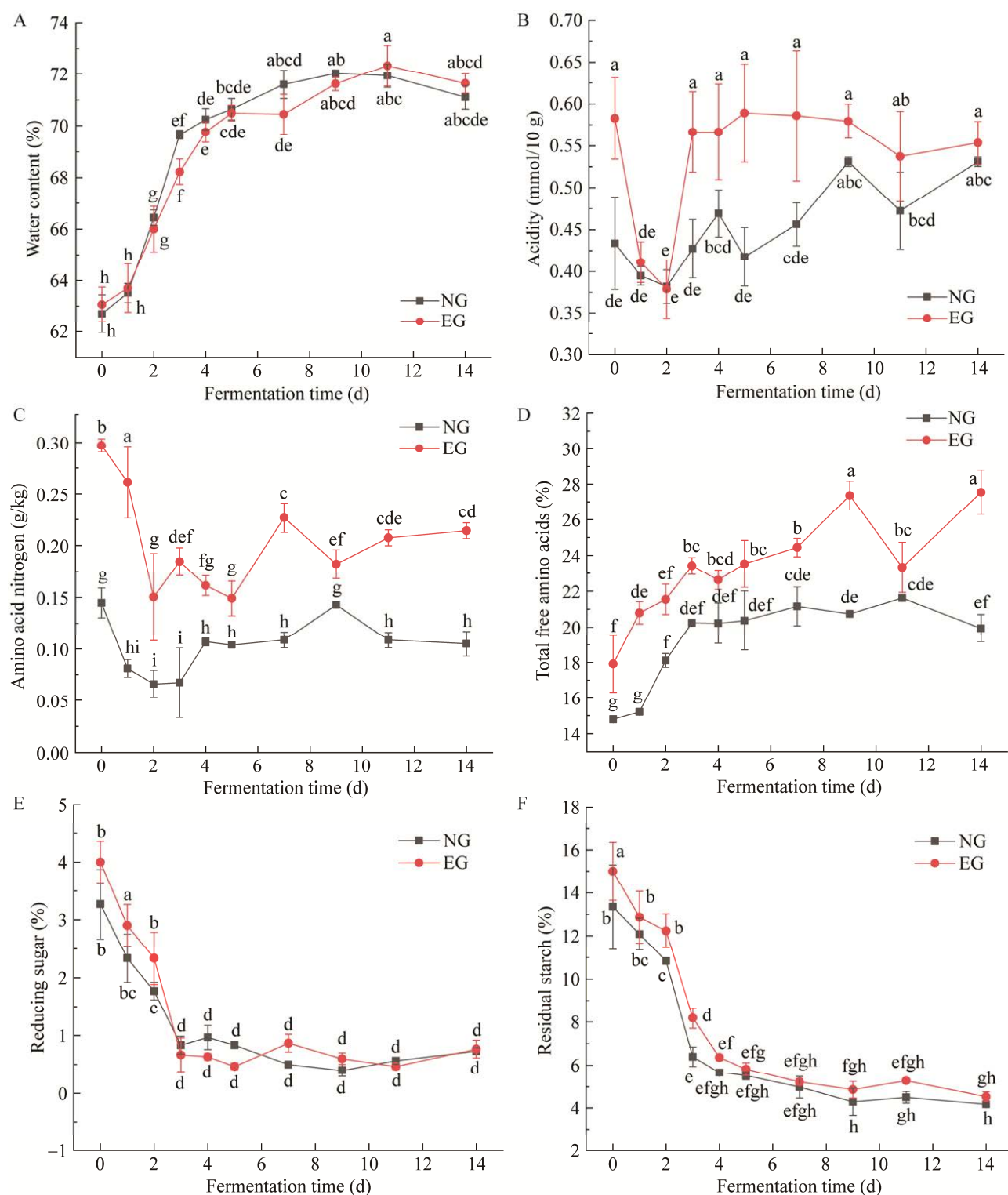


图2 发酵酒醅中环境因子的动态变化 A: 水分. B: 酸度. C: 氨基酸态氮. D: 总游离氨基酸. E: 还原糖. F: 残余淀粉

Figure 2 Dynamic changes of environmental factors in fermented grains. A: Water content. B: Acidity. C: Amino acid nitrogen. D: Total free amino acids. E: Reducing sugar. F: Residual starch.



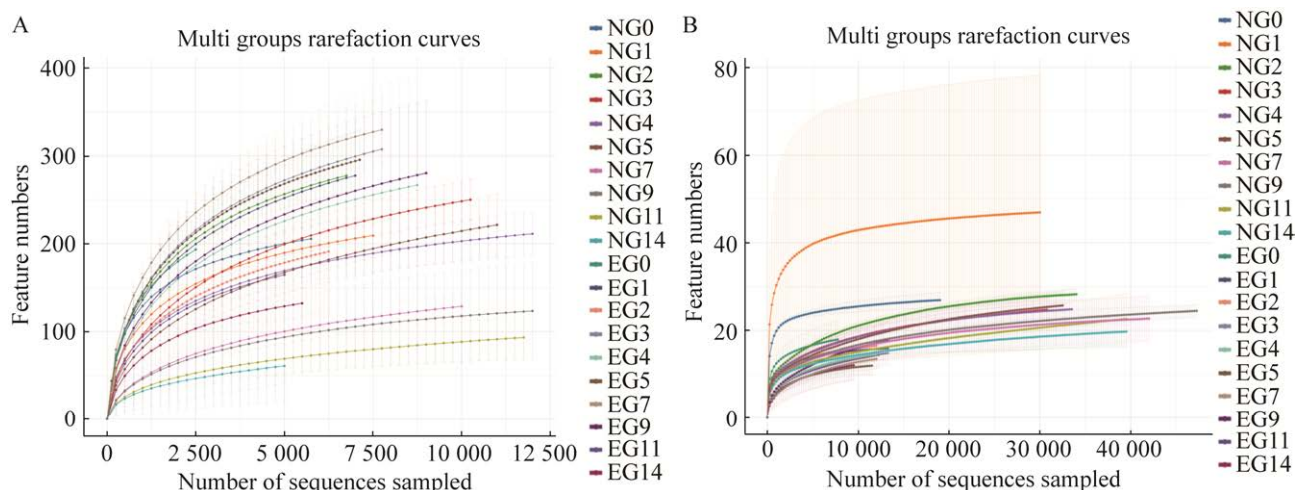


图 3 发酵酒醅中细菌(A)和真菌(B)的稀释曲线

Figure 3 Rarefaction curves of bacterial (A) and fungal (B) community in fermented grains.

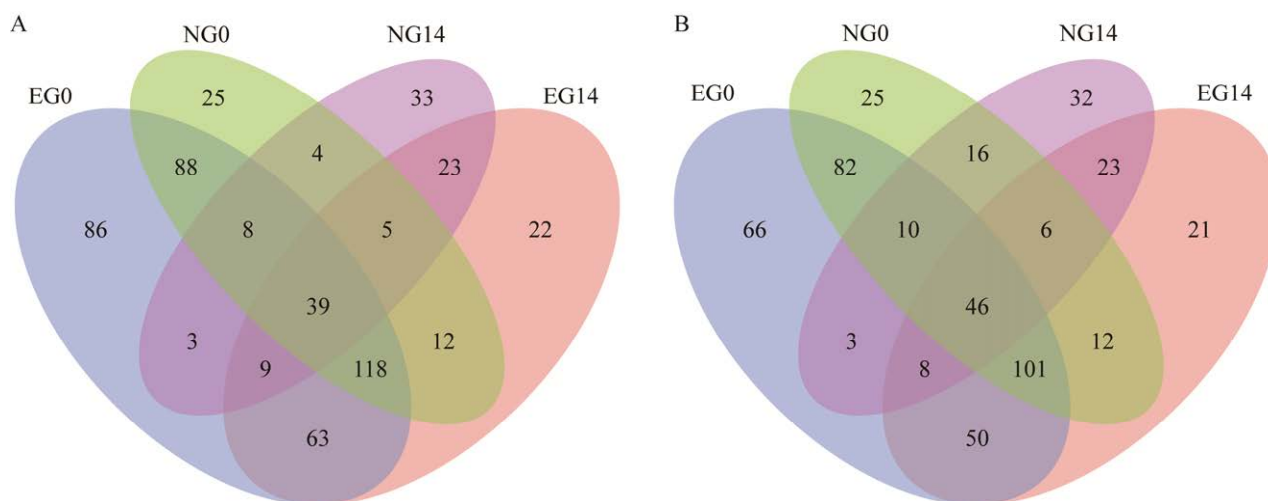


图 4 发酵酒醅中细菌(A)和真菌(B) Venn 图分析

Figure 4 Venn diagrams of bacterial (A) and fungal (B) in fermented grains.

使用 EG 配糟发酵起始真菌和细菌 OTU 数量均多于使用 NG 配糟, 但发酵结束时特有的 OTU 数目少于使用 NG 配糟。

#### 2.4.3 微生物的物种 $\alpha$ 多样性

$\alpha$  多样性反映的是单个样品物种丰度及物种多样性, Shannon 指数可以解释物种分布均匀度, Chao1 指数代表菌种丰富度, Chao1 和 Shannon 指数越大, 说明样品的物种数量和多样性越

高<sup>[13]</sup>。由图 5 可知, 使用 EG 配糟酒醅发酵过程中细菌的 Shannon 和 Chao1 指数均极显著( $P<0.001$ )高于使用 NG 配糟酒醅, 而真菌的 Shannon 指数( $P<0.001$ )和 Chao1 指数( $P<0.05$ )分别极显著、显著低于使用 NG 配糟酒醅, 说明使用 2 种不同发酵周期配糟酒醅微生物多样性存在显著性差异, 且使用 EG 配糟酒醅发酵过程中细菌多样性显著性升高, 而真菌多样性显著性降低。



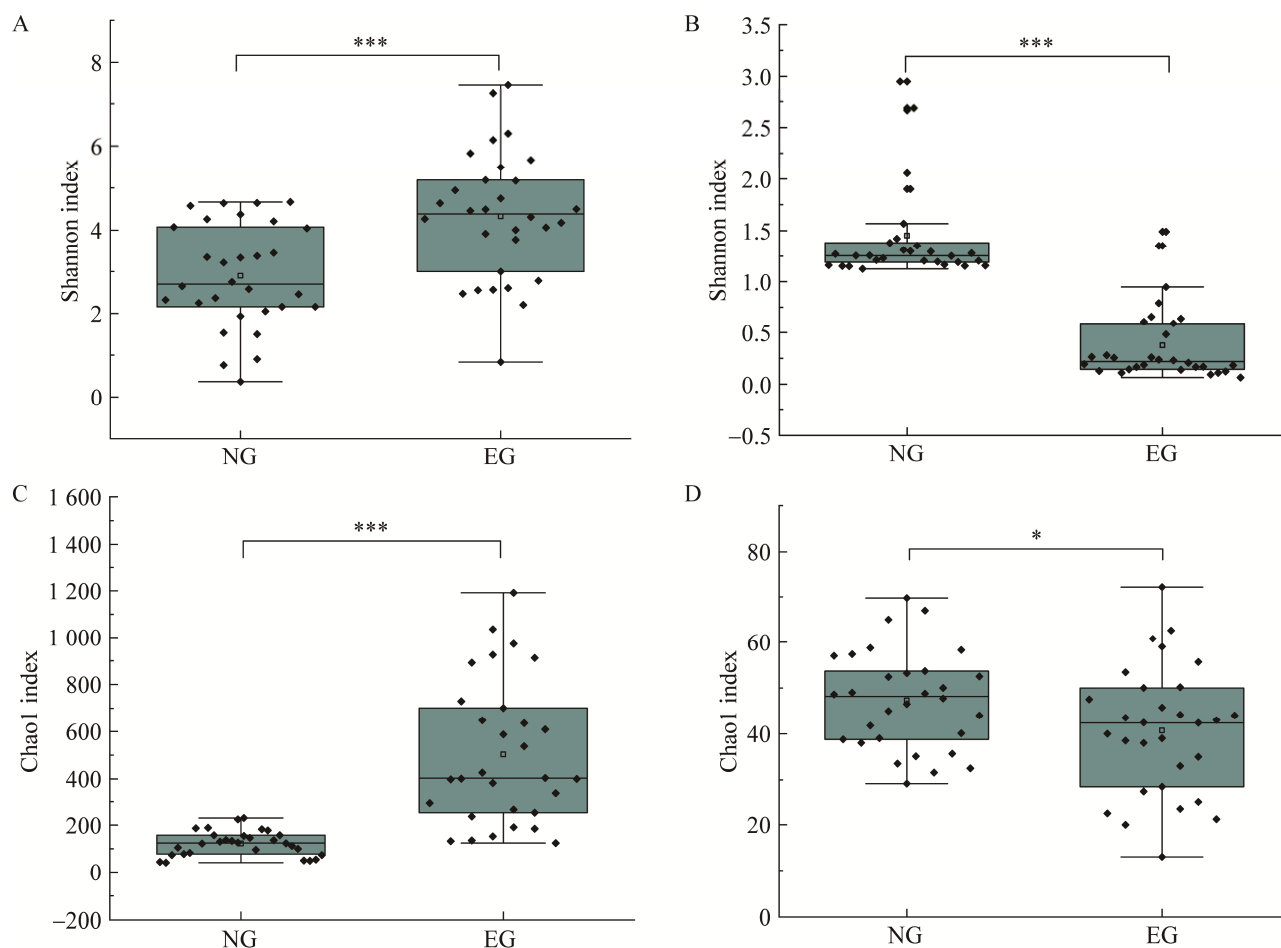


图5 微生物群落  $\alpha$  多样性指数 A: 细菌 Shannon 指数. B: 真菌 Shannon 指数. C: 细菌 Chao1 指数. D: 真菌 Chao1 指数

Figure 5 Microbial community alpha diversity index. A: Bacteria Shannon index. B: Fungi Shannon index. C: Bacteria Chao1 index. D: Fungi Chao1 index. \*:  $P < 0.05$ ; \*\*\*:  $P < 0.001$ .

#### 2.4.4 微生物群落结构组成及动态变化

使用第3代测序技术揭示了使用NG和EG配糟酒醅发酵过程中微生物群落结构的组成。由图6A可知,发酵酒醅中真菌主要是酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)、异常威克汉姆酵母(*Wickerhamomyces anomalus*)和米根霉(*Rhizopus oryzae*)等,发酵2 d后 *S. cerevisiae* 成为优势菌,占绝对主导地位(相对丰度>95%)。发酵0–2 d,使用NG配糟酒醅中 *S. cerevisiae* 相对丰度低于使用EG配糟酒醅,但其他种类真菌相对丰度较高,这与前面的使用NG配糟酒醅中真菌  $\alpha$

多样性高于使用EG配糟酒醅结果一致。

酒醅发酵过程中细菌主要有短乳杆菌(*Levilactobacillus brevis*)、瑞士乳杆菌(*Lactobacillus helveticus*)、巴氏醋杆菌(*Acetobacter pasteurianus*)、桥粘液乳杆菌(*Limosilactobacillus pontis*)和融合魏斯氏菌(*Weissella confusa*)等(图6B),发酵前3天未知细菌占比较高(50%),发酵中后期主要以醋酸菌和乳酸菌为主。*L. brevis* 相对丰度在发酵过程中先增加后下降,且使用EG配糟酒醅该菌相对丰度低于使用NG配糟酒醅;*L. helveticus* 在发酵中后期出现,且使用EG配糟酒醅该菌相对

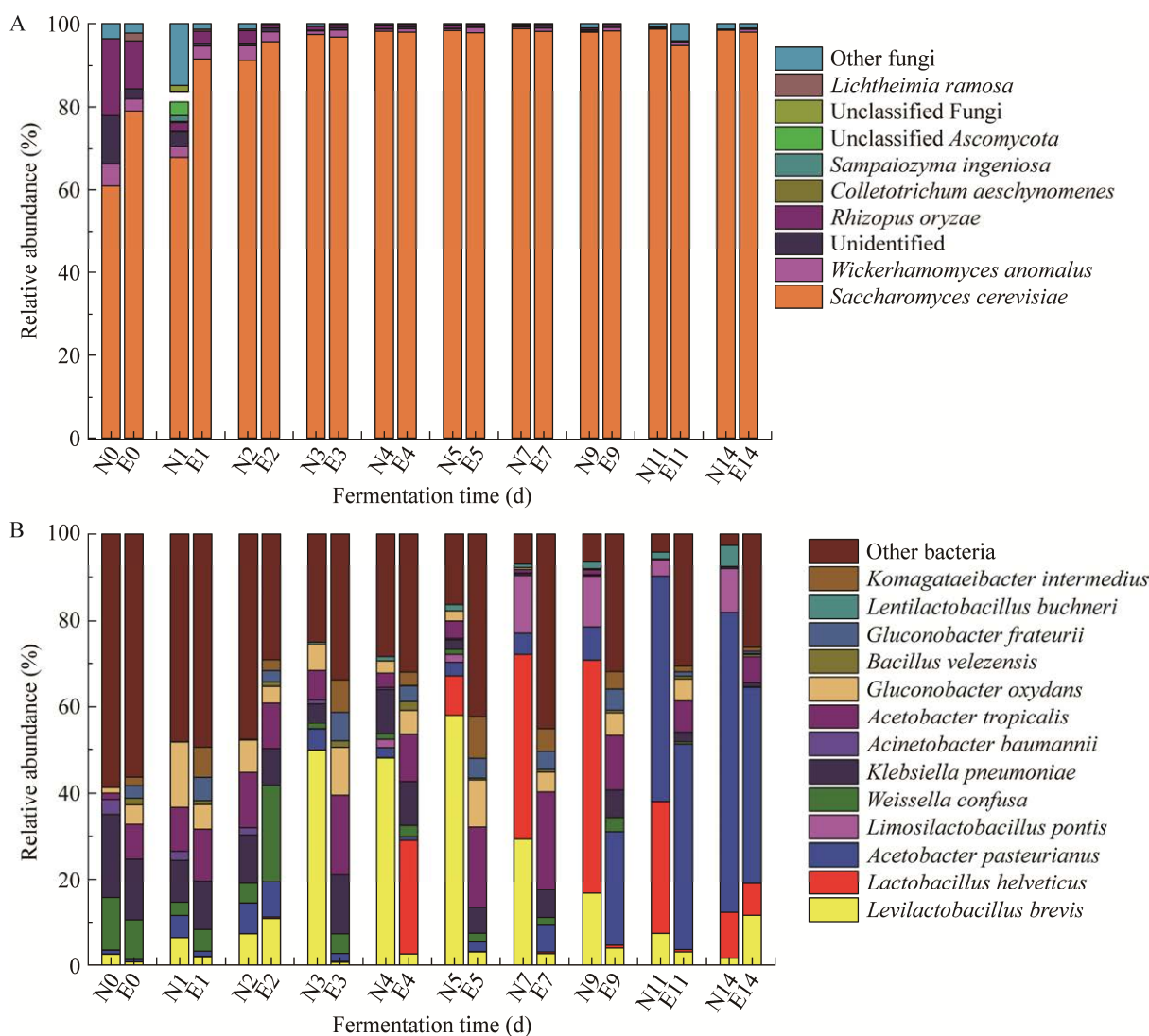


图 6 发酵酒醅中真菌(A)和细菌(B)群落动态变化

Figure 6 Dynamic changes of fungal (A) and bacterial (B) communities in fermented grains.

丰度低于使用 NG 配糟酒醅; *A. pasteurianus* 相对丰度随着发酵时间延长而增加,且在发酵结束时成为优势菌,使用 EG 配糟酒醅相对丰度(45.42%)低于使用 NG 配糟酒醅(69.68%)。相较而言,使用 EG 配糟酒醅中细菌多样性高于使用 NG 配糟酒醅。

#### 2.4.5 使用不同发酵周期配糟发酵酒醅中的特殊微生物群落分析

利用 LEfSe 差异分析发现在不同分类层

级,2 种酒醅中具有显著性差异的生物标志物有 43 个(LDA 阈值为 4),其中细菌有 28 个,11 个为使用 EG 配糟酒醅差异指示种,包括 *W. confusa*、热带醋杆菌(*Acetobacter tropicalis*)、unclassified *Muribaculaceae*、嗜性乳杆菌(*Lactobacillus iners*)、驹形杆菌属(unclassified *Komagataeibacter*)、芽孢杆菌属(unclassified *Bacillus*)、明串珠菌属(unclassified *Leuconostoc*)、台湾乳球菌(*Lactococcus taiwanensis*)、肠杆菌科(unclassified

*Enterobacteriaceae*)和类肠膜魏斯氏菌(*Weissella paramesenteroides*)等。使用 NG 配糟酒醅差异的细菌 17 个, 包括克雷伯氏菌属(*unclassified Klebsiella*)、发酵粘液乳杆菌(*Limosilactobacillus fermentum*)、乳植杆菌属(*unclassified Lactiplantibacillus*)、鲍曼不动杆菌(*Acinetobacter baumannii*)、肠杆菌属(*unclassified Enterobacter*)、斯氏泛菌(*Pantoea septica*)、魏茨曼尼亚菌(*Weizmannia ginsengihum*)、氧化葡萄糖酸杆菌(*Gluconobacter oxydans*)和 *L. pontis* 等(图 7A)。

真菌群落共产生了 15 个差异指示种(图 7B)。其中使用 EG 配糟酒醅中有 7 个差异指示种, 包括 *Rhizopus*、热带假丝酵母(*Candida tropicalis*)、*S. cerevisiae* 和 *W. anomalus* 等。使用 NG 配糟酒醅中有 8 个差异指示种, 包括棒曲霉(*Aspergillus clavatus*)、酵母菌目(*unclassified Saccharomycetales*)、链格孢属(*unclassified Alternaria*)、担子菌门(*unclassified Basidiomycota*)和子囊菌门(*unclassified Ascomycota*)等。

## 2.5 统计学分析

### 2.5.1 偏最小二乘判别分析

对使用 2 种发酵周期配糟酒醅发酵过程中各变量参数进行 PLS-DA 分析, 建立区分使用 2 种配糟的判别分析模型。由 PLS-DA 得分图(图 8A)可知, 在 95% 的置信区间内, 使用 NG 和 EG 配糟的酒醅发酵过程样本表现出明显的聚类趋势, 且在不同区域很好地地区分了 2 种配糟发酵酒醅样本, 说明使用 2 种发酵周期配糟酒醅样本存在着明显的差异。本研究建立的 PLS-DA 模型拟合参数良好,  $R^2(X)=0.59$ ,  $R^2(Y)=0.951$ ,  $Q^2=0.795$ 。其中  $R^2(X)$  越接近 1, 模型越稳定;  $R^2(Y)$  越大, 模型的数据解释比例越高, 该模型可以解释 95.1% 的原始数据; 而  $Q^2>0.5$  说明模型具有较强的预测能力。为了验证模型的可靠性, 对判别模型进行 200 次置换后验证(图 8B),

所有蓝色的  $Q^2$  点均低于最右边的原始的蓝色  $Q^2$  点, 且  $Q^2$  的一元线性回归曲线的纵轴截距小于零, 表明该模型未过拟合, 模型符合统计学要求<sup>[15]</sup>。

变量投影重要度(variable important for the projection, VIP)可以量化 PLS-DA 模型的每个变量对分类的贡献, VIP 值越大, 该变量在使用不同配糟发酵酒醅之间的差异越大, 对样品分类聚集有着关键作用, 一般认为 VIP 值为 1 以上的变量在不同组别之间差异显著<sup>[16]</sup>。如图 8C 所示, 得出 12 个 VIP>1 的变量, 分别为弗托氏葡糖杆菌(*Gluconobacter frateurii*)、氨基酸态氮、贝莱斯芽孢杆菌(*Bacillus velezensis*)、居间驹形氏杆菌(*Komagataeibacter intermedius*)、*A. tropicalis*、总游离氨基酸、酸度、*L. brevis*、布氏乳杆菌(*Lentilactobacillus buchneri*)、*L. pontis*、乳酸菌总数和 *A. baumannii*。由图 8D 载荷图和表 2 单因素方差分析可知, 酸度、氨基酸态氮、总游离氨基酸、*B. velezensis*、*A. tropicalis*、*K. intermedius* 在使用 EG 配糟酒醅中含量显著性较高, 而乳酸菌总数、*L. brevis*、*L. pontis*、*L. buchneri* 和 *A. baumannii* 在使用 NG 配糟酒醅中含量显著性较高。

### 2.5.2 影响微生物群落结构演替的环境因子分析

对使用不同发酵周期配糟所有样本的微生物群落与环境因子进行冗余分析(RDA), 以确定环境因子对微生物群落的影响。结果显示 RDA1 和 RDA2 轴对微生物群落结构的解释度分别为 49.18% 和 13.86% (图 9A), 经过蒙特卡洛置换验证后水分、酸度、氨基酸态氮、还原糖、残余淀粉和总游离氨基酸对微生物群落结构的影响显著( $P<0.05$ )。其中水分、酸度、氨基酸态氮和总游离氨基酸对使用 EG 配糟酒醅样品微生物群落密切相关, 而还原糖和残余淀粉对使用 NG 配糟酒醅样品微生物群落密切相



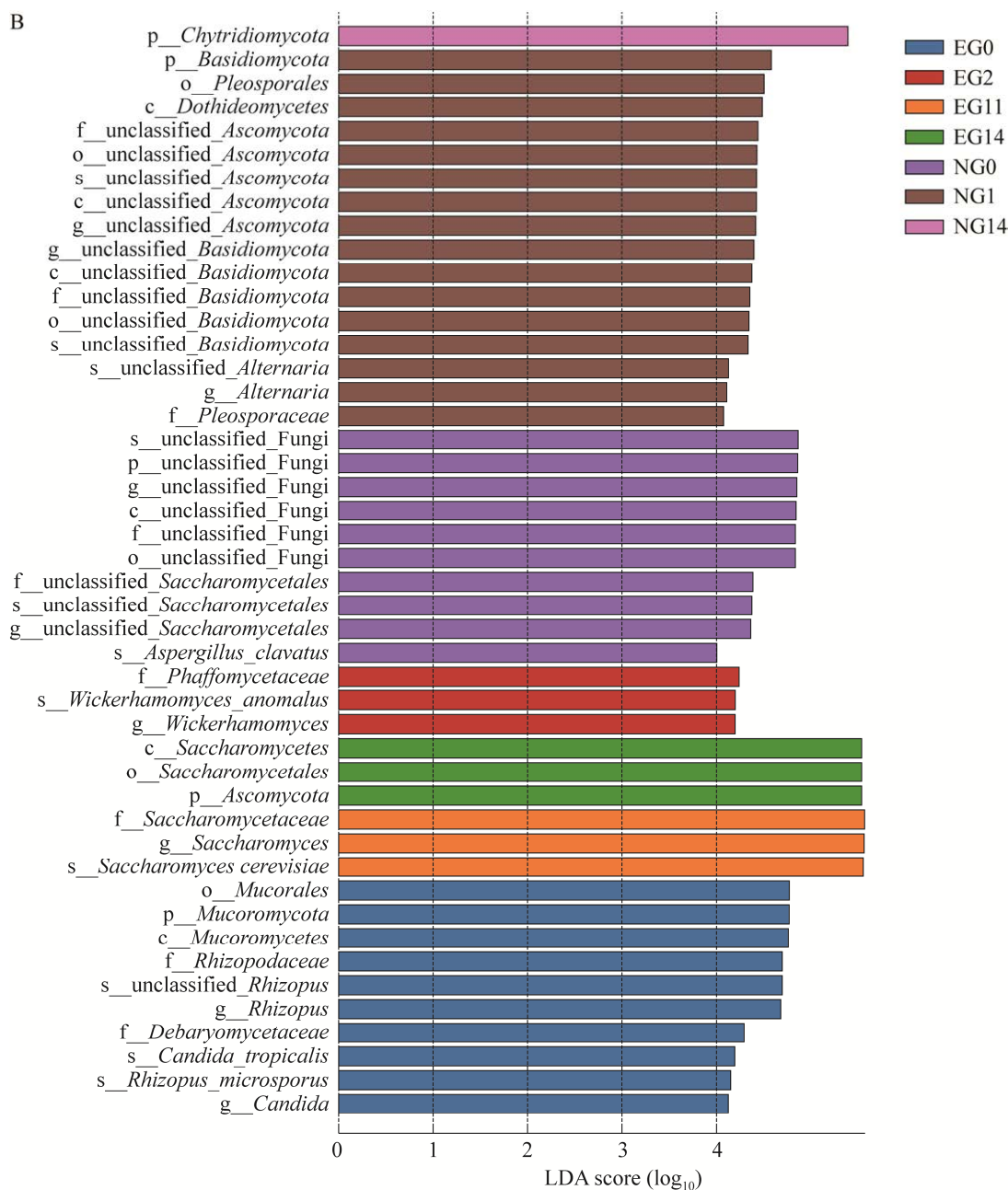


图7 发酵酒醅中特殊微生物群落及其影响力 A: 真菌. B: 细菌. 纵坐标为两组间具有显著差异的分类单元, 横坐标为各显著差异分类单元的 LDA 分析对数得分值; 分类单元按照 LDA 值大小进行排序, LDA 值越高表明该分类单元的差异越显著, 条形图的颜色代表了该分类单元对应丰度较高的样本分组; 小写字母表示差异指示种, p: 门; c: 纲; o: 目; f: 科; g: 属; s: 种

Figure 7 Special microbial communities and their effects in fermented grains. A: Fungus. B: Bacteria. The ordinate displays the taxon with significant differences between two groups, and the horizontal axis represents the LDA score of each taxon; Taxonomies are sorted according to the score value. The higher the LDA score is, the more significant the difference of the taxon is. The color of the bar chart indicates that the taxon corresponds to the sample group with higher abundance. The lowercase letters represent difference indicator at the specie level, p: Phylum; c: Class; o: Order; f: Family; g: Genus; s: Species.



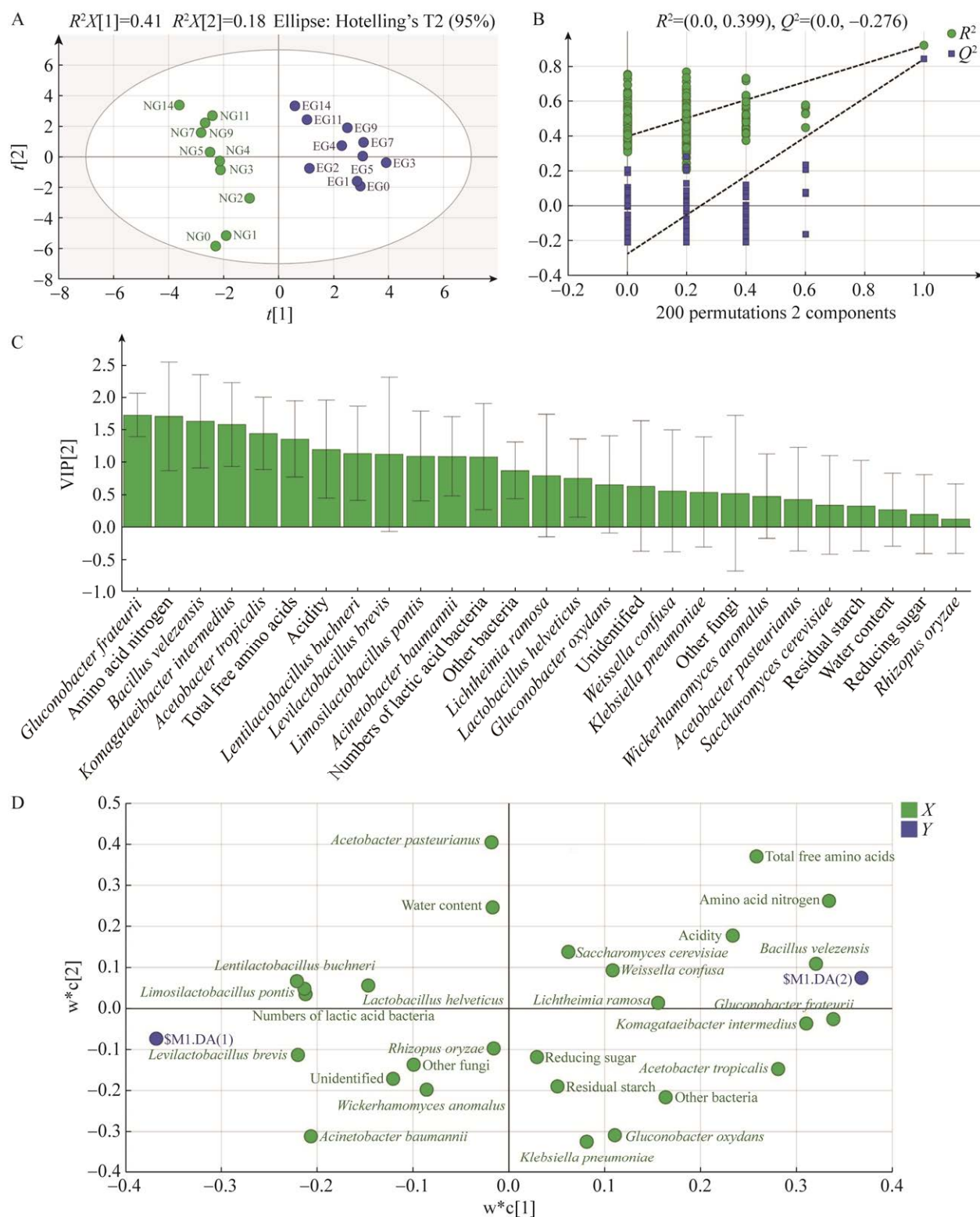


图 8 发酵酒醅中各变量 PLS-DA 分析 A: 得分散点图. B: 200 次排列检验图. C: VIP 图. D: 载荷图  
Figure 8 PLS-DA analysis of all variables in fermented grains. A: Score scatter plot. B: 200 times permutation test plot. C: VIP chart. D: Loading plot.



表 2 发酵酒醅中各变量单因素方差分析

Table 2 ANOVA of all variables in fermented grains

Variables	F value	P value
Acidity	8.33	0.010*
Amino acid nitrogen	32.42	0.000***
Numbers of lactic acid bacteria	6.35	0.021*
Total free amino acids	11.38	0.003**
<i>L. brevis</i>	7.05	0.016*
<i>L. pontis</i>	6.48	0.020*
<i>A. baumannii</i>	5.94	0.025*
<i>A. tropicalis</i>	15.04	0.001**
<i>B. velezensis</i>	26.46	0.000***
<i>L. buchneri</i>	7.16	0.015*
<i>K. intermedius</i>	22.56	0.000***

\*,  $P < 0.05$ ; \*\*,  $P < 0.01$ ; \*\*\*,  $P < 0.001$ .

关, 是主要的驱动因素。环境因子与微生物群落相关性矩阵图见图 9B, 水分与 *S. cerevisiae*、*A. pasteurianus* 和 *L. helveticus* 呈极显著正相关, 与 *W. anomalus*、*R. oryzae*、弗里德兰氏杆菌 (*Klebsiella pneumoniae*)、*W. confusa* 和 *G. oxydans* 呈显著负相关; 酸度与 *S. cerevisiae*、*B. velezensis*、*G. frateurii* 和 *K. intermedius* 呈显著正相关, 与 *W. anomalus*、*A. baumannii* 呈显著负相关; 氨基酸态氮与 *L. ramosa*、*B. velezensis*、*G. frateurii* 和 *K. intermedius* 呈显著正相关, 与 *L. brevis*、*L. pontis*、*A. baumannii*、*L. buchneri* 呈显著负相关; 总游离氨基酸与 *S. cerevisiae*、*G. frateurii* 和 *K. intermedius* 呈极显著正相关, 与 *W. anomalus*、*R. oryzae*、*G. frateurii* 和 *K. intermedius* 呈显著负相关; 还原糖与残余淀粉均与 *W. anomalus*、*R. oryzae*、*W. anomalus* 和 *K. pneumoniae* 呈显著正相关, 与 *S. cerevisiae* 和 *L. helveticus* 呈极显著负相关。

### 3 讨论与结论

本研究采用高通量测序技术对使用正常和延长发酵周期配糟酒醅中微生物菌群演替规律

进行对比分析, 并结合环境因子进行偏最小二乘判别分析、单因素方差分析和相关性分析, 找出使用不同发酵周期配糟对环境因子和微生物群落多样性的影响。发酵酒醅的环境因子和可培养微生物菌群丰度表征了发酵过程酒醅发酵质量、微生物的组成和代谢变化, 为进一步的扩增子测序分析奠定了基础<sup>[17]</sup>。由图 1 可知, 使用 EG 配糟酒醅发酵前 4 天酵母活菌数低于使用 NG 配糟酒醅, 且乳酸菌总数整个发酵过程均较低。从图 2 的环境因子变化规律可以看出, 与使用 NG 配糟酒醅相比, 使用 EG 配糟酒醅发酵过程水分较低, 而酸度、氨基酸态氮、总游离氨基酸、还原糖和残余淀粉较高。本团队前期的研究发现延长发酵周期会导致酒醅中酸度、氨基酸态氮含量增加<sup>[1]</sup>, 因此延长发酵期酒醅蒸馏后作为配糟, 其酸度、氨基酸态氮和总游离氨基酸显著升高(表 1), 将其与新鲜酒醅混合使用导致入池醅(发酵 0 d)的酸度和氨基酸态氮含量显著高于使用正常发酵周期配糟的入池醅, 从而使整个发酵过程中酸度和氨基酸态氮含量均较高。随着初始发酵酸度增加, 酵母和乳酸菌的数量均受到抑制<sup>[18-20]</sup>, 导致使用 EG 配糟酒醅中微生物数量降低。另外, 由于起始酸度的增加, 微生物数量受到抑制会减少酒醅淀粉的消耗, 从而使酒醅中残余淀粉和还原糖较高<sup>[19-20]</sup>。

近年来, 随着白酒生产中微生物多样性研究的不断深入, 高通量测序技术也被普遍应用于白酒微生物领域<sup>[21]</sup>。使用不同发酵周期配糟酒醅中主要微生物的组成相似, 但演替规律不一致(图 6)。发酵酒醅中真菌主要包括 *S. cerevisiae*、*W. anomalus* 和 *R. oryzae* 等, *S. cerevisiae* 在发酵 0-3 d 快速增殖, 3 d 后变化趋于稳定且占绝对主导地位(图 6A); 细菌主要包括 *L. brevis*、*L. helveticus*、*A. pasteurianus*、*L. pontis* 和 *W. confusa* 等, 发酵前 3 天未知细菌占比较高

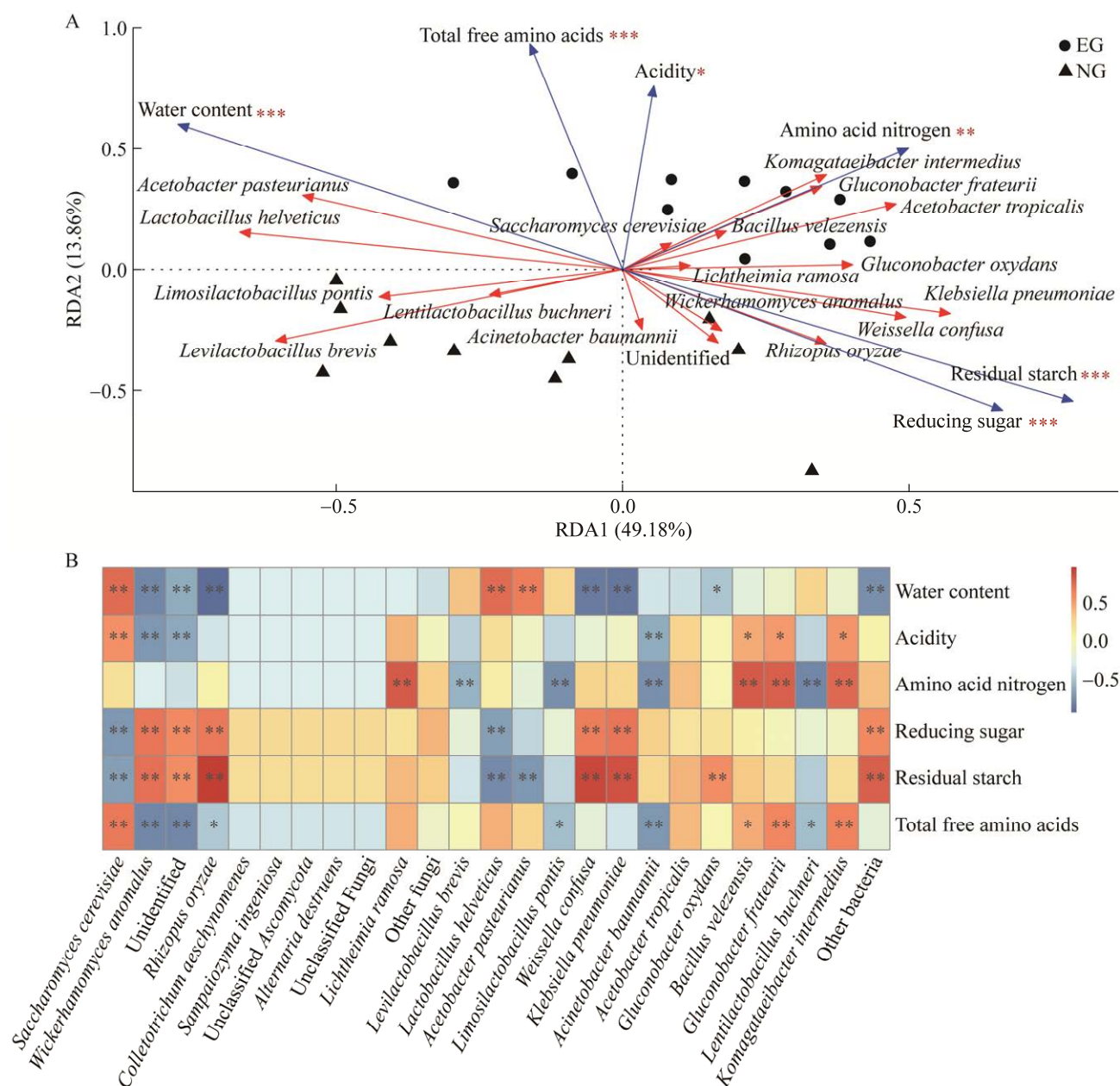


图9 微生物群落与环境因子 RDA 图(A)和相关性矩阵图(B)

Figure 9 RDA plots (A) and correlation matrix (B) of microbial communities and environmental parameters. \*:  $P < 0.05$ ; \*\*:  $P < 0.01$ ; \*\*\*:  $P < 0.001$ .

(50%), 发酵中后期主要以醋酸菌和乳酸菌为主(图 6B)。这与 Shen 等<sup>[5]</sup>研究的清香型白酒微生物群落演替结果一致。 $\alpha$ 多样性结果表明,使用 EG 配糟酒醅中真菌  $\alpha$ 多样性显著/极显著低于使用 NG 配糟酒醅( $P < 0.05$ ,  $P < 0.001$ ),而细菌多样

性极显著高于使用 NG 配糟酒醅( $P < 0.001$ )(图 5)。使用 EG 配糟酒醅的真菌多样性降低可能与其 *S. cerevisiae* 相对丰度较高、真菌种类较少有关,而使用 EG 配糟酒醅的细菌多样性较高可能与其发酵过程中未知类细菌占比较高有关(图 6)。

LEfSe 分析是一种可以发现和解析数据生物标识的非参数 Kruskal-Wallis、Wilcoxon 秩和检验分析方法,并结合 LDA 效应量(effect size),能够在不同组间寻找具有统计学差异的物种(biomarker)<sup>[22]</sup>。LEfSe 分析使用不同发酵周期配糟酒醅中细菌和真菌,发现细菌共产生 28 个差异指示种,其中 11 个为使用 EG 配糟酒醅差异指示种,而真菌共产生了 15 个差异指示种,其中使用 EG 配糟酒醅中有 7 个差异指示种(图 7)。这些差异指示种对使用 EG 和 NG 配糟发酵的酒醅间微生物群落结构组成产生了影响。

PLS-DA 为有监督的分析模式,可以根据已分组的样本信息对训练样本集建立判别模型,该分析方法通常适用于样本容量小于变量数目的情况<sup>[23]</sup>。本研究建立了基于发酵酒醅各变量参数判别使用 NG 配糟和 EG 配糟的 PLS-DA 模型,建立的 PLS-DA 模型可以明显区分使用不同配糟的酒醅样本,且未存离群样本点,模型可用于各自分组的判别分析。结合建立的 PLS-DA 模型中 VIP>1 的变量和单因素方差分析结果,最终确定了 11 个变量是区分使用不同发酵周期配糟酒醅样本的关键因素,分别为酸度、氨基酸态氮、总游离氨基酸、*B. velezensis*、*A. tropicalis*、*K. intermedius* (使用 EG 配糟酒醅中含量显著性较高)和乳酸菌总数、*L. brevis*、*L. pontis*、*L. buchneri* 和 *A. baumannii* (使用 NG 配糟酒醅中含量显著性较高)。这些差异的物种也在 LEfSe 分析中得到体现。

RDA 结果揭示了水分、酸度、氨基酸态氮、还原糖、残余淀粉和总游离氨基酸对微生物群落结构的影响显著( $P<0.05$ ),除了总游离氨基酸,这与本团队前期研究的调节清香型白酒微生物群落的关键理化因子<sup>[14]</sup>一致。水分、还原糖和残余淀粉作为微生物生长和代谢的必需营养物质,在发酵过程中显著影响真菌和细菌群

落的组成<sup>[9,24-25]</sup>。pH 是调节发酵酒醅中微生物群落变化的重要因素,较低的 pH 值(酸度)可以提供酸性条件,通过抑制不必要微生物的生长来改善乳酸菌和酵母的生长<sup>[26]</sup>。氨基酸态氮也被用作鉴别浓香型和酱香型白酒发酵质量的重要指标,在酒醅发酵过程中会通过微生物分解积累<sup>[27-28]</sup>。游离氨基酸作为微生物生长代谢的重要营养底物和环境因子,是青稞酒发酵过程微生物群落演替重要的推动因素<sup>[29]</sup>,本研究结果也证实了此观点。因为使用 EG 配糟导致发酵酒醅中酸度、氨基酸态氮和游离氨基酸含量显著高于使用 NG 配糟(图 2 和表 2),导致这 3 个环境因子对使用 EG 配糟中微生物群落的影响更大(图 9A)。

本研究通过高通量测序结合多元统计分析,揭示了环境因子对清香型白酒发酵过程微生物群落演替的驱动作用,明确了使用不同发酵周期配糟对环境因子变化和微生物多样性的影响,这对于调控白酒酿造微生物生长代谢以及提升白酒品质具有重要意义。

## REFERENCES

- [1] TANG J, LIU YC, LIN B, ZHU H, JIANG W, YANG Q, CHEN SX. Effects of ultra-long fermentation time on the microbial community and flavor components of light-flavor Xiaoku Baijiu based on fermentation tanks[J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2022, 38(1): 3.
- [2] ZHANG M, WU X, MU D, YANG W, JIANG S, SUN W, SHEN Y, CAI J, ZHENG Z, JIANG S, LI X. Profiling the effects of physicochemical indexes on the microbial diversity and its aroma substances in pit mud[J]. Letters in Applied Microbiology, 2020, 71(6): 667-678.
- [3] REN TT, SU W, MU YC, QI Q, ZHANG DW. Study on the correlation between microbial communities with physicochemical properties and flavor substances in the Xiasha round of cave-brewed sauce-flavor Baijiu[J]. Frontiers in Microbiology, 2023, 14: 1124817.
- [4] 孙细珍, 杜佳伟, 黄盼, 张帆, 刘源才. 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.
- SUN XZ, DU JW, HUANG P, ZHANG F, LIU YC. Analysis of sensory characteristics and flavor components in light-flavor Chinese liquor (*Baijiu*) made with Xiaoqu starter by modern and traditional technologies[J]. Food Science, 2021, 42(6): 282-290 (in Chinese).
- [5] SHEN DJ, SHEN HY, YANG Q, CHEN SX, DUN YH, LIANG YX, ZHENG JS, ZHAO SM. Deciphering succession and assembly patterns of microbial communities in a two-stage solid-state fermentation system[J]. Microbiology Spectrum, 2021, 9(2): e0071821.
- [6] 陶雪, 吕佳顺, 许华杰, 熊小燕, 金曙光. 酒糟综合利用研究进展及茅台实践[J]. 中国酿造, 2023, 42(6): 22-27.
- TAO X, LV JS, XU HJ, XIONG XY, JIN SG. Research progress on comprehensive utilization of distillers' grains and practices of Moutai[J]. China Brewing, 2023, 42(6): 22-27 (in Chinese).
- [7] 彭奎, 张磊, 杜鹏程, 刘新宇, 刘念, 王超凯, 常少健, 李冕, 杨亚娇, 杨天涯, 倪海斌. 延长浓香型白酒发酵周期对白酒产香的影响[J]. 食品研究与开发, 2023, 44(6): 134-139.
- PENG K, ZHANG L, DU PC, LIU XY, LIU N, WANG CK, CHANG SJ, LI M, YANG YJ, YANG TY, NI HB. Effects of prolonged fermentation period of Luzhou-flavored liquor on liquor aroma production[J]. Food Research and Development, 2023, 44(6): 134-139 (in Chinese).
- [8] 胡雨楠, 张钟晓, 陈小雪, 薛岩松, 韩北忠. 发酵时间对清香型白酒二茬基酒风味物质组成及含量的影响[J]. 中国酿造, 2021, 40(9): 165-172.
- HU YN, ZHANG ZX, CHEN XX, XUE YS, HAN BZ. Effects of fermentation time on the flavor profiles of Ercha base liquor of light-flavor *Baijiu*[J]. China Brewing, 2021, 40(9): 165-172 (in Chinese).
- [9] GUAN TW, LIN YJ, CHEN KB, OU MY, ZHANG JX. Physicochemical factors affecting microbiota dynamics during traditional solid-state fermentation of Chinese strong-flavor *Baijiu*[J]. Frontiers in Microbiology, 2020, 11: 2090.
- [10] FAN GS, FU ZL, TENG C, LIU PX, WU QH, RAHMAN MKR, LI XT. Effects of aging on the quality of roasted sesame-like flavor Daqu[J]. BMC Microbiology, 2020, 20(1): 67.
- [11] ZHU LP, LI LQ, YANG Q, CHEN L, ZHANG L, ZHANG G, LIN B, TANG J, ZHANG ZJ, CHEN SX. Study on microbial community of "green-covering" Tuqu and the effect of fortified autochthonous *Monascus purpureus* on the flavor components of light-aroma-type *Baijiu*[J]. Frontiers in Microbiology, 2022, 13: 973616.
- [12] 食品安全国家标准. GB5009.124—2016. 食品中氨基酸的测定[S]. 北京: 中国标准出版社, 2016.
- National Food Safety Standards. GB5009.124—2016. Determination of amino acids in foods[S]. Beijing: Standards Press of China, 2016 (in Chinese).
- [13] CAPORASO JG, KUCZYNSKI J, STOMBAUGH J, BITTINGER K, BUSHMAN FD, COSTELLO EK, FIERER N, PEÑA AG, GOODRICH JK, GORDON JI, HUTTLEY GA, KELLEY ST, KNIGHTS D, KOENIG JE, LEY RE, LOZUPONE CA, McDONALD D, MUEGGE BD, PIRRUNG M, REEDER J, et al. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data[J]. Nature Methods, 2010, 7(5): 335-336.
- [14] LIN B, TANG J, YANG Q, SU ZX, ZHU LP, LI Q, JIANG W, ZHANG L, LIU YC, CHEN SX. Microbial succession and its effect on key aroma components during light-aroma-type Xiaoqu *Baijiu* brewing process[J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2022, 38(10): 1-14.
- [15] BORRÀS E, FERRÉ J, BOQUÉ R, MESTRES M, ACEÑA L, CALVO A, BUSTO O. Olive oil sensory defects classification with data fusion of instrumental techniques and multivariate analysis (PLS-DA)[J]. Food Chemistry, 2016, 203: 314-322.
- [16] 樊杉杉, 唐洁, 乐细选, 杨强, 刘源才, 陈双, 徐岩, 范文来, 陈申习. 基于 HS-SPME-Arrow-GC-MS 和化学计量学的小曲清香型原酒等级判别[J]. 食品与发酵工业, 2021, 47(13): 254-260.
- FAN SS, TANG J, YUE XX, YANG Q, LIU YC, CHEN S, XU Y, FAN WL, CHEN SX. Grade discrimination of Xiaoqu light aroma *Baijiu* based on HS-SPME-Arrow-GC-MS and chemometrics[J]. Food and Fermentation Industries, 2021, 47(13): 254-260 (in Chinese).
- [17] HUANG XN, FAN Y, LU T, KANG JM, PANG XN, HAN BZ, CHEN JY. Composition and metabolic functions of the microbiome in fermented grain during light-flavor *Baijiu* fermentation[J]. Microorganisms, 2020, 8(9): 1281.
- [18] 邓星成, 黄治国, 姚亚林, 江科, 邓杰, 任志强. 初始酸度对酿酒酵母发酵的影响[J]. 中国酿造, 2023,

- 42(2): 115-119.  
DENG XC, HUANG ZG, YAO YL, JIANG K, DENG J, REN ZQ. Effect of initial acidity on fermentation of *Saccharomyces cerevisiae*[J]. China Brewing, 2023, 42(2): 115-119 (in Chinese).
- [19] 李义, 邓杰, 张娟, 黄治国, 刘勇, 任志强. 大曲白酒发酵中不同入窖酸度对糟醅微生物群落结构的影响[J]. 现代食品科技, 2023, 39(7): 68-74.  
LI Y, DENG J, ZHANG J, HUANG ZG, LIU Y, REN ZQ. Effects of mash acidity on the microbial community structure of fermenting grains during the brewing of Daqu *Baijiu*[J]. Modern Food Science and Technology, 2023, 39(7): 68-74 (in Chinese).
- [20] 姚亚林. 酸度对白酒固态发酵产酒的影响[D]. 自贡: 四川轻化工大学硕士学位论文, 2021.  
YAO YL. Effect of acidity on liquor production by solid-state fermentation of liquor[D]. Zigong: Master's Thesis of Sichuan University of Science & Engineering, 2021 (in Chinese).
- [21] 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).
- [22] SEGATA N, IZARD J, WALDRON L, GEVERS D, MIROPOLSKY L, GARRETT WS, HUTTENHOWER C. Metagenomic biomarker discovery and explanation[J]. Genome Biology, 2011, 12(6): R60.
- [23] 田甜, 韦锦坚, 文金华, 曾祥林. 不同季节凌云白毫绿茶的香气成分差异分析[J]. 食品科学, 2020, 41(22): 252-259.  
TIAN T, WEI JJ, WEN JH, ZENG XL. Seasonal variability of aroma components of Lingyun pekoe green tea[J]. Food Science, 2020, 41(22): 252-259 (in Chinese).
- [24] LI P, LIN WF, LIU X, WANG XW, LUO LX. Environmental factors affecting microbiota dynamics during traditional solid-state fermentation of Chinese Daqu starter[J]. Frontiers in Microbiology, 2016, 7: 1237.
- [25] JIANG J, LIU YC, LI HH, YANG Q, WU Q, CHEN SX, TANG J, XU Y. Modeling and regulation of higher alcohol production through the combined effects of the C/N ratio and microbial interaction[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2019, 67(38): 10694-10701.
- [26] PANG XN, HUANG XN, CHEN JY, YU HX, WANG XY, HAN BZ. Exploring the diversity and role of microbiota during material pretreatment of light-flavor *Baijiu*[J]. Food Microbiology, 2020, 91: 103514.
- [27] ZHANG QY, YUAN YJ, LIAO ZM, ZHANG WX. Use of microbial indicators combined with environmental factors coupled with metrology tools for discrimination and classification of *Luzhou*-flavoured pit muds[J]. Journal of Applied Microbiology, 2017, 123(4): 933-943.
- [28] ZHAO XX, LIU YH, SHU L, HE YG. Study on metabolites of *Bacillus* producing soy sauce-like aroma in Jiang-flavor Chinese spirits[J]. Food Science & Nutrition, 2020, 8(1): 97-103.
- [29] 王宇乔, 黄和强, 王石垒, 穆晓清, 李善文, 祁万军, 孔令武, 吴群, 冯声宝, 徐岩. 氨基酸对青稞酒酿造微生物群落演替及风味代谢的驱动[J]. 微生物学通报, 2021, 48(2): 414-425.  
WANG YQ, HUANG HQ, WANG SL, MU XQ, LI SW, QI WJ, KONG LW, WU Q, FENG SB, XU Y. Effects of amino acids on microbial community succession and flavor metabolism in highland barley *Baijiu* fermentation[J]. Microbiology China, 2021, 48(2): 414-425 (in Chinese).