

高通量测序技术分析浓香型白酒中温曲和高温曲的细菌群落结构

刘延波¹, 赵志军¹, 陈黄翌¹, 孙西玉^{1,2}, 潘春梅¹

(1. 河南牧业经济学院生物工程学院, 河南郑州 450046) (2. 张弓老酒酒业有限公司, 河南宁陵 476733)

摘要: 本文通过 Illumin 公司 Miseq 2×300 bp 测序平台对浓香型白酒中温曲和高温曲进行高通量测序分析, 发现以丰度>0.01% 为阈值, 中温曲中细菌共得到 7 个门, 高温曲 15 个门, 中温曲共得到 19 个属, 高温曲 26 个属。首次从中温曲中检测出的类群有 *Pediococcus*(小球菌属), *Pantoea*(泛菌属), *Melghirimyces*。高温曲中检测出的类群有 *Streptophyta*, *Brevibacterium*(短杆菌属), *Thermus*(栖热菌属), *Saccharopolyspora*, *Citrobacter*(柠檬酸杆菌属), *Streptococcus*(链球菌), *Brevundimonas*(短波单胞菌属), *Allobacillus*。此外研究发现高温曲中的细菌较中温曲的细菌相比 *Bacillus*(芽孢杆菌属)和 *Thermoactinomyces*(高温放线菌属)显著上升, 而 *Kroppenstedtia* 和 *Lactobacillus*(乳杆菌属)显著下降, 可能是与张弓酒独特的制曲工艺有关。本研究建立了一套高通量测序技术分析浓香型白酒大曲细菌群落结构的方法, 为建立浓香型白酒大曲微生物信息数据库, 优化大曲发酵工艺和提升品质提供理论依据。

关键词: 高通量测序; 中温曲; 高温曲; 细菌群落结构

文章编号: 1673-9078(2018)05-229-235

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2018.05.033

Analysis of Bacterial Community Structure in Medium Temperature Daqu and High Temperature Daqu of Luzhou-flavor Liqu by High-throughput Sequencing

LIU Yan-bo¹, ZHAO Zhi-jun¹, CHEN Huang-zhao¹, SUN Xi-yu^{1,2}, PAN Chun-mei¹

(1. College of Biology Engineering, Henan University of Animal Husbandry and Economy, Zhengzhou 450046, China)

(2. ZhangGongLaoJiu Wine Co. Ltd., Ningling 476733, China)

Abstract: The medium temperature Daqu and high temperature Daqu of Luzhou-flavor Liqu were analyzed by High-throughput sequencing through Illumin Miseq 2×300 bp sequencing platform, which revealed that 7 phyla and 19 genera were obtained from medium temperature Daqu and 15 phyla and 26 genera were obtained from high temperature Daqu at the threshold of abundance > 0.01%. The first group detected from the medium temperature Daqu was *Pediococcus*, *Pantoea* and *Melghirimyces*. The strains detected in the high temperature Daqu were *Streptophyta*, *Brevibacterium*, *Thermus*, *Saccharopolyspora*, *Citrobacter*, *Streptococcus*, *Brevundimonas*, and *Allobacillus*. In addition, the study also found that *Bacillus* and *Thermoactinomyces* in the high temperature Daqu were significantly increased compared to the bacteria in medium temperature Daqu, while *Kroppenstedtia* and *Lactobacillus* were significantly decreased, probably due to the unique production Daqu technology of Zhanggong. In this study, we established a high-throughput sequencing technique to analyze the bacterial community structure of Luzhou-flavor liquor, which provided theoretical basis for establishing microorganism information database of Luzhou-flavor liquor, optimizing Daqu fermentation technology and improving quality.

Key words: high-throughput sequencing; medium temperature Daqu; high temperature Daqu; bacterial community structure

浓香型白酒以其“窖香浓郁、绵柔甘冽、香味协调”的酒体风格在我国白酒行业中占据主导地位^[1]。大曲

收稿日期: 2016-12-06

基金项目: 微生物学河南省教学团队和河南牧业经济学院青年科研创新基金项目 (XKYCXJJ2017015)

作者简介: 刘延波 (1983-), 男, 博士, 讲师, 研究方向: 微生物学

通讯作者: 潘春梅 (1976-), 女, 博士, 教授, 研究方向: 发酵工程

作为酿酒的动力在浓香型白酒的酿造中起着举足轻重的作用, 自古就有“酒之骨”之称。大曲的质量对酒的质量和出酒率都有极大的影响^[2]。由于大曲采用生料制曲、自然接种, 即原料没有经过灭菌, 而且菌种还可来自制曲环境中的空气和工具, 涉及的微生物种类和数量都极为复杂。因此也是酿酒微生物研究的重要内容^[3,4]。而大曲中细菌的构成及其衍变情况对形成浓

香型白酒的酒体风格具有重要影响^[5]。

传统分离培养单个微生物的方法只能对大曲中极少数能分离的菌种进行研究^[6,7], 存在很大的局限, 无法全面揭示大曲微生物的结构特征。早期研究获得微生物遗传信息多样性的方法主要包括末端限制性片段长度多态性分析、变性梯度凝胶电泳(DGGE)、16S rDNA 克隆文库分析和荧光原位杂交^[8], 以上方法主要基于传统 Sanger 测序技术来开展, 测序通量有限且只能检测环境中部分高丰度菌株的微生物信息, 无法一次性全面获得整个环境中微生物的多样性及功能基因信息。也不能对样品中微生物群落进行较为完备的测序研究, 同时工作量大、灵敏度不高。高通量测序技术对微生物群落结构的研究有其明显的先进性和优势, 准确定量、读长长、实时检测等^[9,10]。可以快捷方便的读取样品中复杂的微生物结构, 是分析复杂多菌种样品的首选方法^[11,12]。目前, 高通量测序技术已经运用于分子生物学领域^[13]和土壤微生物群落研究^[14,15]。但目前应用高通量测序技术对浓香型白酒酿造微生物的研究报道较少, 仅有陈玲等^[16]以浓香型白酒大曲为研究对象, 基于 16S rRNA 基因为目的片段, 分别采用微生物指纹图谱分析技术 16S rDNA 克隆文库法和高通量测序法分析了大曲中细菌微生物群落的组成。浓香型白酒大曲分中温曲和高温曲, 针对单一品种大曲的细菌群落信息研究报道很多^[17,18], 较全面地分析中温和高温大曲中细菌群落结构的研究却未见报道。

本试验运用高通量测序技术, 利用 Illumina 公司 Miseq 测序平台对浓香型大曲白酒酿造中的中温曲和高温曲进行研究, 分析浓香型大曲白酒酿造过程中主要细菌构成, 建立一套高通量测序技术分析浓香型白酒大曲细菌的方法, 同时通过数据分析, 完整的解析浓香型白酒大曲中细菌的群落结构。为建立浓香型白酒大曲微生物信息数据库, 优化大曲发酵工艺和提升品质提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

实验用的大曲材料是贮存 5 个月的浓香型白酒大曲, 由张弓老酒酒业有限公司提供。分为中温曲和高温曲两种。分别粉碎后于迅速置于冰盒运回, -20 °C 保藏备用^[19]。

1.2 试验试剂与仪器

E.Z.N.A. Soil DNA Kit 购自 OMEGA Bio-tek Inc.; Qubit2.0 DNA 检测试剂盒购于 Life Technologies Corporation; Taq DNA Polymerase 购于 Thermo Fisher Scientific; Agencourt AMPure XP 购于 Beckman coulter。

台式离心机, Thermo Fisher; 漩涡混合器, 海门市其林贝尔仪器制造有限公司; 混匀型干式恒温器, 深圳拓能达科技有限公司; 电泳槽和电泳仪电源, 北京市六一仪器厂; 凝胶成像系统, 美国 UVP; Qubit® 2.0 荧光计, Invitrogen; PCR 仪, BIO-RAD; 移液器, Eppendorf; 高通量测序平台, Illumina 公司 Miseq 2×300 bp 测序平台。

1.3 基因组 DNA 提取

分别取中温曲和高温曲粉碎混匀后的样品, 每个样品 0.2~0.3 g, 参照 OMEGA 试剂盒 E.Z.N.A.TM Mag-Bind Soil DNA Kit 提取大曲中微生物总宏基因组, 琼脂糖电泳检测 DNA 总量和完整性, -20 °C 保存。

1.4 PCR 扩增

第一轮扩增, 利用 Qubit 2.0 DNA 检测试剂盒对基因组 DNA 精确定量, 以确定 PCR 反应应加入的 DNA 量。PCR 所用的引物已经融合了 Miseq 测序平台的 V3-V4 通用引物^[20]。341F 引物: CCCTACAC GACGCTCTCCGATCTG(barcode)CCTACGGGNGG CWGCAG 805R 引物: GACTGGAGTTCCTTGGC ACCCGAGAATTCCAGACTACHVGGGTATCTAATC C 产物长度约 460 bp。PCR 反应体系为 50 μL。体系包括: 5 μL 10×PCR buffer, 0.5 μL dNTP(10 mM each), 10 ng Genomic DNA, 0.5 μL Bar-PCR primer F(50 μM), 0.5 μL Primer R (50 μM), 0.5 μL Plantium Taq(5 U/μL)加 ddH₂O 到 50 μL。PCR 反应程序为: 94 °C, 3 min; 94 °C, 30 s; 45 °C, 20 s; 65 °C, 30 s, 5 cycles; 94 °C, 20 s; 55 °C, 20 s; 72 °C, 30 s, 20 cycles; 72 °C 延伸 5 min。PCR 结束后进行第二轮扩增。

第二轮扩增, 引入 Illumina 桥式 PCR 兼容引物。PCR 反应体系为 50 μL。体系包括: 5 μL 10×PCR buffer, 0.5 μL dNTP(10 mM each), 20 ng DNA, 0.5 μL primer F(50 μM), 0.5 μL Primer R (50 μM), 0.5 μL Plantium Taq(5 U/μL)加 ddH₂O 到 50 μL。PCR 反应程序为: 95 °C, 30 s; 95 °C, 15 s; 55 °C, 15 s; 72 °C, 30 s, 5 cycles; 72 °C 延伸 5 min。PCR 结束后, 产物进行琼脂糖电泳检测, 凝胶成像观察, 扩增效果较好(图 1)。

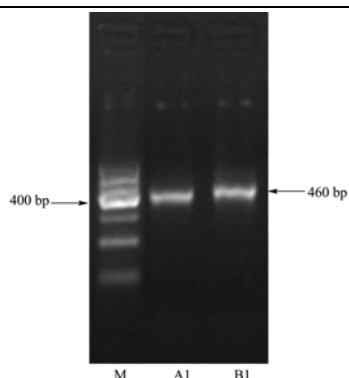


图1 中温曲和高温曲的PCR产物鉴定

Fig.1 PCR product identification of medium temperature Daqu and high temperature Daqu

注: A1 为中温曲, B1 为高温曲。

1.5 DNA 纯化回收

参照 Agencourt AMPure XP 核酸纯化试剂盒说明书回收纯化目的条带。

1.6 定量混合和高通量测序

利用 Qubit2.0 DNA 检测试剂盒对回收的 DNA 精确定量, 以方便按照 1:1 的等量混合后测序。等量混

合时, 每个样品 DNA 量取 10 ng, 最终上机测序浓度为 20 pmol^[21,22]。委托生工生物工程(上海)股份有限公司采用 Illumin 公司 Miseq 2×300 bp 测序平台进行高通量测序^[23]。

2 结果与讨论

2.1 测序数据的合理性分析

对中温曲和高温曲样品采用试剂盒提取基因组 DNA 后, 对 18S V3-V4 区进行高通量测序, 细菌引物设计长度为 460 bp 左右, 测序平均长度 462 bp, 可以看出序列平均长度和序列总数显示测序结果较好。由于 Hiseq 双端测序原始序列 3'端可能带有 adaptor 接头序列, 以及一些少量低质量序列和杂质序列, 为了提高后续分析质量和可靠性, 对原始序列进行去接头、质量剪切等处理。质控后的序列长度为去除 barcode、两端 primer、以及部分低质量序列的统计结果。中温曲有 41989 个序列, 平均长度 421 bp, 高温曲有 44762 个序列, 平均长度 419 bp, 再通过去除嵌合体与靶区域外序列发现, 中温曲有 41333 个序列, 高温曲有 43287 个序列(表 1)。

表 1 中温曲和高温曲基本测序数据

Table 1 Basic sequencing data of medium temperature Daqu and high temperature Daqu

样品	Barcode	Raw_num	Mean_len	Clean_num	Mean_len	Out_target_num	Chimeras_num	Filtered_num
中温曲	AGACTG	42063	463.1	41989	421.7	4	652	41333
高温曲	CGTGGT	44828	460.8	44762	419.7	96	1379	43287

2.2 细菌 OTU (Operational Taxonomic Units)

分类

根据 97%水平下 OTU 的丰度, 对测序产生的标签序通过聚类分析划分操作单元, 其中中温曲有 2026 个 OTU 序列, 高温曲有 2961 个(表 2)。

中的物种多样性^[24], 通常用 shannon 指数, chao 值以及 simpson 值来衡量微生物物种的多样性。其中, shannon 指数值越高, 物种多样性越丰富, simpson 值越高, 物种多样性越少。其中高温曲的 shannon 指数 3.807674 比中温曲的 2.827305 高, 而 simpson 值 0.081072 比 0.181327 低, 所以高温曲样本中的微生物多样性与中温曲不同, 复杂度明显比中温曲高。两种大曲的样本覆盖率均高于 94%, 因此均能较客观地反映大曲样本中细菌微生物菌群结构的真实信息(表 2)。

2.3 α 多样性分析

α 多样性分析是用来表征某个特殊区域或者生境

表 2 中温曲和高温曲的细菌多样性指数

Table 2 Bacterial diversity index of medium temperature Daqu and high temperature Daqu

样品名	Seq_num	OTU_num	Shannon_index	ACE_index	Chao1_index	Coverage	Simpson
中温曲	41333	2026	2.827305	57816.17	19078.61	0.956669	0.181327
高温曲	43287	2961	3.807674	32541.54	14367.29	0.946728	0.081072

2.4 大曲细菌门科分类

通过软件分析以丰度>0.01%为阈值, 中温曲共得到 7 个门。高温曲 15 个门。以丰度>0.5 为阈值, 中

温曲共得到 3 个门, 分别是: 是 Firmicutes(厚壁菌门, 35823,86.67%), 其次为 Proteobacteria(变形菌门, 4511,10.91%), Cyanobacteria/Chloroplast(蓝藻菌门, 779,1.88%)。

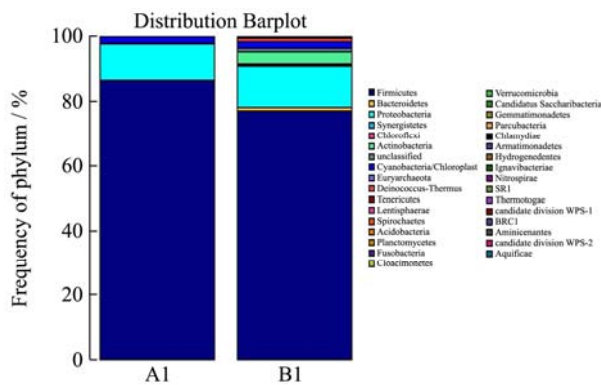


图2 中温曲和高温曲细菌门类分类

Fig.2 Classification of medium temperature Daqu and high temperature Daqu

注: A1 为中温曲, B1 为高温曲。

高温曲共得到 6 个门, 分别是: *Firmicutes*(厚壁菌门, 33400,77.16%), *Proteobacteria*(变形菌门, 5430,12.54%), *Actinobacteria*(放线菌门, 1677,3.87%), *Cyanobacteria/Chloroplast*(蓝藻菌门, 901,2.08%), *Bacteroidetes*(拟杆菌门, 523,1.21%), *Deinococcus-Thermus*(异常球菌-栖热菌门, 508,1.17%)(图2)。

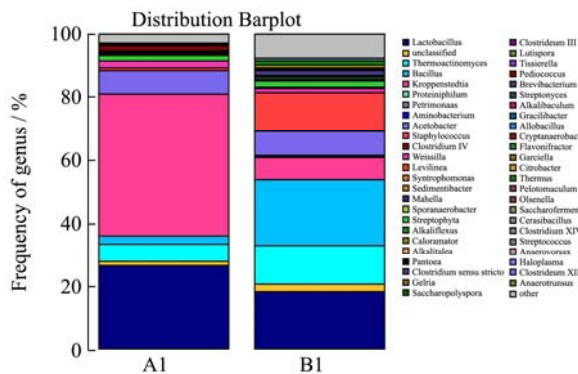


图3 中温曲和高温曲的细菌群落结构

Fig.3 Bacterial community structure of medium temperature Daqu and high temperature Daqu

注: A1 为中温曲, B1 为高温曲。

以丰度>0.01%为阈值, 中温曲共得到 19 个属, 高温曲 26 个属。以丰度>0.5 为阈值, 中温曲共得到 12 个属, 分别是 *Kroppenstedtia*(45.11%), *Lactobacillus*(乳杆菌属, 26.36%), *Acetobacter*(醋酸单胞菌属, 7.45%), *Thermoactinomyces*(高温放线菌属, 5.43%), *Bacillus*(芽孢杆菌属, 2.56%), *Weissella*(魏斯氏菌属, 2.2%), *Streptophyta*(1.88%), *Pediococcus*(小球菌属, 1.61%), *unclassified*(1.47%), *Pantoea*(泛菌属, 1.46%), *Staphylococcus*(葡萄球菌属, 0.88%), *Oceanobacillus*(海洋杆菌属, 0.58%), *Melghirimyces*(0.5%)。高温曲有 15 个属分别是 *Bacillus*(芽孢杆菌属, 20.93%), *Lactobacillus*(乳杆菌属, 18%), *Staphylococcus*

(葡萄球菌属, 12.33%), *Thermoactinomyces*(高温放线菌属, 12.29%), *Acetobacter*(醋酸单胞菌属, 7.69%), *Kroppenstedtia*(6.9%), *unclassified*(2.55%), *Streptophyta*(1.96%), *Brevibacterium*(短杆菌属, 1.63%), *Weissella*(1.22%), *Thermus*(栖热菌属, 1.17%), *Saccharopolyspora*(0.9%), *Citrobacter*(柠檬酸杆菌属, 0.87%), *Streptococcus*(链球菌, 0.83%), *Brevundimonas*(短波单胞菌属, 0.67%), *Allobacillus*(0.6%)(图3)。

3 结论

3.1 本实验通过高通量测序法分析了浓香型大曲中细菌的群落结构。发现中温曲中细菌主要分布于 *Firmicutes*(厚壁菌门, 86.67%), *Proteobacteria*(变形菌门, 10.91%), *Cyanobacteria/Chloroplast*(蓝藻菌门, 1.88%)。高温曲中主要分布于 *Firmicutes*(厚壁菌门, 77.16%), *Proteobacteria*(变形菌门, 12.54%), *Actinobacteria*(放线菌门, 3.87%), *Cyanobacteria/Chloroplast*(蓝藻菌门, 2.08%), *Bacteroidetes*(拟杆菌门, 523,1.21%), *Deinococcus-Thermus*(异常球菌-栖热菌门, 1.17%), 陈玲等(2015)研究发现大曲中的微生物主要分布于 *Firmicutes*(厚壁菌门)、*Proteobacteria*(变形菌门)、*Actinobacteria*(放线菌门)和 *Cyanobacteria/Chloroplast*(蓝藻菌门)4 个菌门^[16]。本文研究结果与和陈玲的基本一致。*Bacteroidetes*(拟杆菌门)被王明跃等(2014)发现在窖泥细菌中为优势分类门^[25]。

3.2 在属的分类水平上分析, 优势类群(丰度>1%)中温曲有 10 个类群, 分别是 *Kroppenstedtia*(45.11%), *Lactobacillus*(乳杆菌属, 26.36%), *Acetobacter*(醋酸单胞菌属, 7.45%), *Thermoactinomyces*(高温放线菌属, 5.43%), *Bacillus*(芽孢杆菌属, 2.56%), *Weissella*(魏斯氏菌属, 2.2%), *Streptophyta*(1.88%), *Pediococcus*(小球菌属, 1.61%), *unclassified*(未分类细菌, 1.47%), *Pantoea*(泛菌属, 1.46%)。高温曲有 11 个类群: *Bacillus*(芽孢杆菌属, 20.93%), *Lactobacillus*(乳杆菌属, 18%), *Staphylococcus*(葡萄球菌属, 12.33%), *Thermoactinomyces*(高温放线菌属, 12.29%), *Acetobacter*(醋酸单胞菌属, 7.69%), *Kroppenstedtia*(6.9%), *unclassified*(未分类细菌, 2.55%), *Streptophyta*(1.96%), *Brevibacterium*(短杆菌属, 1.63%), *Weissella*(魏斯氏菌属, 1.22%), *Thermus*(栖热菌属, 1.17%)。孟镇等(2010)和张明春等(2010)研究得出大曲中的优势类群为 *Lactobacillaceae*(乳杆菌科)^[26,27];高亦豹等(2010)用 PCR-DGGE 未培养技术对中国白酒高温和中温大曲细菌群落结构的分析发现 *Lactobacillaceae*(乳杆菌科)、*Staphylococcus*(葡萄球菌

属)、*Klebsiella*(克雷伯属)、*Thermoactinomyces*(高温放线菌属)和 *Weissella*(魏斯氏菌属)普遍存在于不同工艺大曲中^[28]; 汤斌等(2011)通过构建 16S rDNA 克隆文库,得出大曲中细菌微生物主要为 *Lactobacillaceae*(乳杆菌科)和 *Bacillus*(芽孢杆菌属)^[29]; 明红梅等(2013)采用传统培养方法得出浓香型大曲中的细菌优势类群分别为 *Bacillus*(芽孢杆菌属)、*Pseudomonas*(假单胞菌)、*Lactobacillaceae*(乳杆菌科)以及 *Acetobacter*(醋酸单胞菌属)^[30]; 陈玲等(2015)研究发现在属的分类水平下, *Bacillus*(芽孢杆菌属)、*Lactobacillaceae*(乳杆菌科)、*Pseudomonas*(假单胞菌)、*Streptomyces*(链霉菌属)为大曲中的主要类群^[16]。*Oceanobacillus*(海洋杆菌属)是熊小毛等(2014)通过 PCR-DGGE 分析典型的浓酱兼香型白酒白云边酒大曲时发现的^[31]; *Pediococcus*(小球菌属), *Pantoea*(泛菌属), *Streptophyta* 和 *Brevibacterium*(短杆菌属)是李德林等(2014)采用 PCR-DGGE 方法研究浓香型白酒糟醅微生物群落结构中发现的^[32]。

以上研究报道与本次高通量测序结果相似,相对其它研究方法高通量测序发现了更多的细菌类群。本文首次从浓香型白酒中温曲中检测出的类群有 *Pediococcus*(小球菌属), *Pantoea*(泛菌属), *Melghirimyces*。从高温曲中检测出的类群有 *Streptophyta*, *Brevibacterium*(短杆菌属), *Thermus*(栖热菌属), *Saccharopolyspora*, *Citrobacter*(柠檬酸杆菌属), *Streptococcus*(链球菌), *Brevundimonas*(短波单胞菌属), *Allobacillus*。

3.3 大曲中的主要细菌 *Bacillus*(芽孢杆菌属)具有耐盐、耐酸和耐高温等特点,能够产生各种代谢产物和酶,代谢产物和酶进一步发生酯化生化反应,生成白酒的呈香呈味物质,形成白酒的有效质量成分^[33]。*Lactobacillus*(乳杆菌属)是白酒生产中非常重要的微生物之一,在酿造过程中具有促进美拉德反应、促进酿酒的发酵、维护与保持酿酒微生态环境等作用^[34]。*Thermoactinomyces*(高温放线菌属)具有典型放线菌形态,系统进化却更接近于芽孢杆菌,具有较强的耐高温能力^[35]。*Kroppenstedtia* 是姚粟等(2012年)利用通过构建 16S rDNA 克隆文库非培养技术研究芝麻香型白酒高温大曲细菌群落多样性发现的的优势属^[36]。此外研究还发现高温曲中的细菌较中温曲的细菌相比 *Bacillus*(芽孢杆菌属)和 *Thermoactinomyces*(高温放线菌属)显著上升,而 *Kroppenstedtia* 和 *Lactobacillus*(乳杆菌属)显著下降,原因可能是张弓酒独特的制曲工艺有关,其在制曲温度上中温大曲采用中温偏高的培曲温度,高温大曲制曲工艺采取麦草堆盖和较高的制曲温度^[37]。高温曲以高温培菌,在细菌菌群构成上以高

温嗜热菌为主。中温曲以中温培菌,因此菌群则以常温菌为主,两类大曲菌群不同的代谢特征对白酒风味形成将产生不同影响,表现出白酒的特有风格。

3.4 本研究发现高通量测序技术可以应用于微生物群落的物种分类研究,其具有操作简单、通量较高和信息丰富等优点,在分析大曲细菌群落的研究中具有一定的优越性。利用该研究成果可以进一步在酒曲中选育与酒曲性能相关的功能菌株,为深入研究浓香型白酒大曲微生物,优化大曲工艺及提高酒曲质量指明了方向,具有重要的理论和实践意义。

参考文献

- [1] 邓杰,黄治国,卫春会,等.基于高通量测序的浓香型白酒窖池细菌群落结构分析[J].现代食品科技,2015,7:50-55
DENG Jie, HUANG Zhi-guo, WEI Chun-hui, et al. High-throughput sequencing reveals bacterial structure in the mud pits of heavy-fragrance Baijiu [J]. Modern Food Science and Technology, 2015, 7: 50-55
- [2] 胡承,郭捷锋,沈才洪,等.浓香型(泸型)大曲的研究及其应用[J].酿酒科技,2004,1:33-36
HU Cheng, WU Jie-feng, SHEN Cai-hong, et al. Research on Luzhou-flavor Daqu starter and its application [J]. Liquor-Making Science and Technology, 2004, 1: 33-36
- [3] 程光胜.中国酒曲微生物利用的发展现状[J].酿酒科技,2014,3:122-124
CHENG Guang-sheng. Present situations of the utilization of microbes in Chinese Jiuqu [J]. Liquor-Making Science and Technology, 2014 3: 122-124
- [4] 邢钢,敖宗华,邓波.大曲中微生物研究和检测进展[J].酿酒科技,2012,12:86-89
XING Gang, AO Zong-hua, DENG Bo. Research and detection progress of microbes in Daqu [J]. Liquor-Making Science and Technology, 2012, 12: 86-89
- [5] 胡佳,邓斌,张文学,等.浓香型白酒曲药中细菌组成及系统学分析[J].酿酒科技,2007,5:17-19
HU Jia, DENG Bin, ZHANG Wen-xue, et al. Phylogenetic analysis of bacterial composition in Luzhou-flavor liquor Qu Yao [J]. Liquor-Making Science and Technology, 2007, 5: 17-19
- [6] Amann R I, Ludwig W, Schleifer K H. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation [J]. Microbiological Reviews, 1995, 59(1): 143-169
- [7] Nogales B, Moore E R B, Llobet-Brossa E, et al. Combined use of 16S ribosomal DNA and 16S rRNA to study the

- bacterial community of polychlorinated biphenyl-polluted soil [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2001, 67(4): 1874-1884
- [8] Curtis T P, Sloan W T, Scannell J W. Estimating prokaryotic diversity and its limits [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2002, 99(16): 10494-10499
- [9] Li R, Zhu H, Ruan J, et al. De novo assembly of human genomes with massively parallel short read sequencing [J]. *Genome Research*, 2010, 20(2): 265-272
- [10] Yang F, Zeng X, Ning K, et al. Saliva microbiomes distinguish caries-active from healthy human populations [J]. *The ISME Journal*, 2012, 6(1): 1-10
- [11] 秦楠, 栗东芳, 杨瑞馥. 高通量测序技术及其在微生物学研究中的应用[J]. *微生物学报*, 2011, 51(4): 445-457
QIN Nan, LI Dong-fang, YANG Rui-fu. Next generation sequencing technologies and the application in microbiology-A review [J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2011, 51(4): 445-457
- [12] Soon W W, Hariharan M, Snyder M P. High-throughput sequencing for biology and medicine [J]. *Molecular Systems Biology*, 2013, 9(1): 640
- [13] Maccallum I, Przybylski D, Gnerre S, et al. ALLPATHS 2: small genomes assembled accurately and with high continuity from short paired reads [J]. *Genome Biology*, 2009, 10(10): 1
- [14] Andersson A F, Lindberg M, Jakobsson H, et al. Comparative analysis of human gut microbiota by barcoded pyrosequencing [J]. *PLoS One*, 2008, 3(7): e2836
- [15] Chu H, Fierer N, Lauber C L, et al. Soil bacterial diversity in the Arctic is not fundamentally different from that found in other biomes [J]. *Environmental Microbiology*, 2010, 12(11): 2998-3006
- [16] 陈玲, 袁玉菊, 曾丽云, 等. 16S rDNA 克隆文库法与高通量测序法在浓香型大曲微生物群落结构分析中的对比研究[J]. *酿酒科技*, 2015, 12: 33-36
CHEN Ling, YUAN Yu-ju, ZENG Li-yun, et al. 16S rDNA clone library vs. high-throughput sequencing method in the analysis of the microbial communities in Nongxiang Daqu [J]. *Liquor-Making Science and Technology*, 2015, 12: 33-36
- [17] Wang C, Shi D, Gong G. Microorganisms in Daqu: a starter culture of Chinese Maotai-flavor liquor [J]. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2008, 24(10): 2183-2190
- [18] 杨代永, 范光先, 汪地强, 等. 高温大曲中的微生物研究[J]. *酿酒科技*, 2007, 5: 37-38
YANG Dai-yong, FAN Guang-xian, WANG Di-qiang, et al. Microbes in high temperature starter [J]. *Liquor-Making Science and Technology*, 2007, 5: 37-38
- [19] 乔晓梅, 赵景龙, 杜小威, 等. 高通量测序法对清香大曲真菌群落结构的分析[J]. *酿酒科技*, 2015, 4: 28-31
QIAO Xiao-mei, ZHAO Jing-long, DU Xiao-wei, et al. Analysis of fungal communities of Qingxiang daqu by barcoded pyrosequencing [J]. *Liquor-Making Science and Technology*, 2015, 4: 28-31
- [20] Fadrosh D W, Ma B, Gajer P, et al. An improved dual-indexing approach for multiplexed 16S rRNA gene sequencing on the Illumina MiSeq platform [J]. *Microbiome*, 2014, 2(1): 6
- [21] Xu C L, Sun R, Qiao X J, et al. Protective effect of glutamine on intestinal injury and bacterial community in rats exposed to hypobaric hypoxia environment [J]. *World Journal of Gastroenterology: WJG*, 2014, 20(16): 4662
- [22] Zhou H W, Li D F, Tam N F Y, et al. BIPES, a cost-effective high-throughput method for assessing microbial diversity [J]. *The ISME Journal*, 2011, 5(4): 741-749
- [23] Schloss P D, Westcott S L, Ryabin T, et al. Introducing mothur: open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2009, 75(23): 7537-7541
- [24] Whittaker R H. Evolution and measurement of species diversity [J]. *Taxon*, 1972: 213-251
- [25] 王明跃, 张文学. 浓香型白酒两个产区窖泥微生物群落结构分析[J]. *微生物学通报*, 2014, 41(8): 1498-1506
WANG Ming-yue, ZHANG Wen-xue. Analysis of microbial community structure in pit mud from two Chinese Luzhou-flavor liquor producing areas [J]. *Microbiology*, 2014, 41(8): 1498-1506
- [26] 孟镇, 熊正河, 钟其顶, 等. 应用 PCR-DGGE 技术解析白酒大曲细菌群落结构[J]. *食品与发酵工业*, 2010, 10: 159-162
MENG Zhen, XIONG Zheng-he, ZHONG Qi-ding, et al. Application of PCR-DGGE to analysis of bacteria community structure of Daqu [J]. *Food and Fermentation Industries*, 2010, 10: 159-162
- [27] 张明春, 曹敬华, 向苇, 等. 白云边酿酒大曲微生物分析研究[J]. *酿酒科技*, 2010, 2: 65-67
ZHANG Ming-chun, CAO Jing-hua, XIANG Wei, et al. Analysis of microbes in Baiyunbian Daqu [J]. *Liquor-Making Science and Technology*, 2010, 2: 65-67
- [28] 高亦豹, 王海燕, 徐岩. 利用 PCR-DGGE 未培养技术对中国白酒高温和中温大曲细菌群落结构的分析[J]. *微生物学通*

- 报,2010,37(7):999-1004
- GAO Yi-bao, WANG Hai-yan, XU Yan. PCR-DGGE analysis of the bacterial community of Chinese liquor high and medium temperature Daqu [J]. *Microbiology*, 2010, 37 (7): 999-1004
- [29] 汤斌,刘金英,周庆武,等.免培养技术对浓香型白酒大曲中细菌多样性的影响[J].食品与发酵工业,2011,37(9):36-40
- TANG Bin, LIU Jin-ying, ZHOU Qing-wu, et al. Phylogenetic diversity analyse of bacteria in Gujing-flavor liquor Daqu using culture independent method [J]. *Food and Fermentation Industries*, 2011, 37(9): 36-40
- [30] 明红梅,董瑞丽,许德富,等.浓香型大曲中优势菌的分离及初步鉴定[J].酿酒科技,2013,12:63-66
- MING Hong-mei, DONG Rui-li, XU De-fu, et al. Separation and preliminary identification of dominant microbes in Nong-flavor Daqu [J]. *Liquor-Making Science and Technology*, 2013, 12: 63-66
- [31] 熊小毛,严楠峰,黄莹娜,等.兼香型白云边酒不同工艺高温大曲差异性分析[J].酿酒科技,2014,1:006
- XIONG Xiao-mao, YAN Nan-feng, HUANG Ying-na, et al. Analysis of the difference in physiochemical indexes and microbial quantity of Baiyunbian high-temperature Daqu produced by different techniques [J]. *Liquor-Making Science and Technology*, 2014, 1: 006
- [32] 李德林,张宿义,毛振宇,等.PCR-DGGE 对浓香型白酒糟醅微生物群落结构解析[J].酿酒科技,2014,3:25-27
- LI De-lin, ZHANG Su-yi, MAO Zhen-yu, et al. Analysis of microbial communities in fermented grains of Nong-xiang type Baijiu(liquor) by PCR-DGGE [J]. *Liquor-Making Science and Technology*, 2014, 3: 25-27
- [33] 黄永光,黄平,涂华彬.窖泥微生物总 DNA 的提取纯化研究[J].酿酒科技,2004,3:41-42
- HUANG Yong-guang, HUANG Ping, TU Hua-bin. Research on extraction and purification of total DNA of microbes in pit mud [J]. *Liquor-Making Science and Technology*, 2004, 3: 41-42
- [34] Lonvaud-Funel A. Lactic acid bacteria in the quality improvement and depreciation of wine [M]. *Lactic Acid Bacteria: Genetics, Metabolism and Applications*. Springer Netherlands, 1999
- [35] Yoon J H, Park Y H. Phylogenetic analysis of the genus *Thermoactinomyces* based on 16S rDNA sequences [J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2000, 50(3): 1081-1086
- [36] 姚粟,葛媛媛,李辉,等.利用非培养技术研究芝麻香型白酒高温大曲的细菌群落多样性[J].食品与发酵工业,2012, 38(6):1-6
- YAO Su, GE Yuan-yuan, LI Hui, et al. Analysis on bacterial communities in high temperature Daqu of sesame flavor liquor through culture-tree Approach [J]. *Food and Fermentation Industries*, 2012, 38(6): 1-6
- [37] 孙西玉,潘春梅.张弓酒典型风格及其成因研究[J].酿酒科技,2006,9:94-95
- SUN Xi-yu, PAN Chun-mei. Studies on the typical style of Zhanggong liquor and its origin [J]. *Liquor-Making Science and Technology*, 2006, 9: 94-95