



基于宏基因组学解析不同质量等级中温大曲微生物组的异质性

刘文虎^{1,2,3}, 柴丽娟^{1,2*}, 张立强³, 陆震鸣^{1,2}, 张晓娟^{1,2}, 王松涛^{3,4}, 沈才洪⁴, 史劲松⁵, 许正宏^{1,2,4*}

1 江南大学粮食发酵与食品生物制造国家工程研究中心, 江苏 无锡 214122

2 江南大学生物工程学院, 江苏 无锡 214122

3 泸州品创科技有限公司, 四川 泸州 646000

4 国家固态酿造工程技术研究中心, 四川 泸州 646000

5 江南大学生命科学与健康工程学院, 江苏 无锡 214122

刘文虎, 柴丽娟, 张立强, 陆震鸣, 张晓娟, 王松涛, 沈才洪, 史劲松, 许正宏. 基于宏基因组学解析不同质量等级中温大曲微生物组的异质性[J]. 微生物学报, 2023, 63(11): 4383-4398.

LIU Wenhui, CHAI Lijuan, ZHANG Liqiang, LU Zhenming, ZHANG Xiaojuan, WANG Songtao, SHEN Caihong, SHI Jinsong, XU Zhenghong. Metagenomics unveils the microbiome heterogeneity of medium-temperature Daqu with different quality grades[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2023, 63(11): 4383-4398.

摘要:【目的】中温大曲是浓香型白酒酿造中的糖化发酵剂和生香剂, 目前其质量评价主要依赖于感官和理化特征。已有研究采用扩增子测序初步探索了大曲质量等级与微生物群落组成之间的关联性, 但是微生物群落功能对大曲质量的影响尚缺乏深入研究。【方法】本研究采用宏基因组学解析和对比了不同质量等级大曲的微生物群落组成和潜在功能的差异, 结合理化性质, 聚焦分析了酶活、乳酸和乙酸代谢相关的关键酶基因丰度。【结果】两种等级大曲的真菌群落组成差异显著。一级大曲含有更高相对丰度的丝状真菌, 主要分布在曲霉属(*Aspergillus*, 21.6%)、罗萨氏菌属(*Rasamsonia*, 6.8%)、拟青霉属(*Paecilomyces*, 5.0%)和篮状菌属(*Talaromyces*, 4.4%)等。一级大曲中与环境信息处理和细胞过程相关途径的基因相对丰度普遍显著高于二级大曲。一级大曲中薄层菌属(*Hymenobacter*)和曲霉属等提供了更高基因丰度的 α -淀粉酶, 使其具有显著较高的液化力。

资助项目: 国家重点研发计划(2018YFE0127400); 国家自然科学基金(31901117); 四川省科技厅项目(2021ZYD0102)
This work was supported by the National Key Research and Development Program of China (2018YFE0127400), the National Natural Science Foundation of China (31901117), and the Project of the Science and Technology Department of Sichuan Province (2021ZYD0102).

*Corresponding authors. CHAI Lijuan, Tel/ Fax: +86-510-85918206, E-mail: chailijuan2017@jiangnan.edu.cn;

XU Zhenghong, E-mail: zhenghuxu@jiangnan.edu.cn

Received: 2023-04-05; Accepted: 2023-06-28; Published online: 2023-07-06

二级大曲则含有更高相对丰度的横梗霉属(*Lichtheimia*, 11.8%)、根霉属(*Rhizopus*, 13.4%)和毕赤酵母属(*Pichia*, 7.2%)以及乳酸菌类微生物, 如伴生乳杆菌属(*Companilactobacillus*)、魏斯氏菌属(*Weissella*)和黏液乳杆菌属(*Limosilactobacillus*)等。二级大曲中与代谢相关途径的基因相对丰度显著较高, 如碳水化合物代谢、能量代谢和核苷酸代谢等。二级大曲中较多的乳酸菌类群有利于提高乙醇脱氢酶基因丰度, 同时, 糖多孢菌属(*Saccharopolyspora*)、葡萄球菌属(*Staphylococcus*)、曲霉属和高温放线菌属(*Thermoactinomyces*)等提供了更多的羧酸酯酶基因丰度, 分别使其具有较高的发酵力和酯化力。此外, 二级大曲中较多的乳酸菌还可能产生更多的乳酸脱氢酶, 降解乳酸, 且更高基因丰度的乙酸代谢相关酶类可促进乙酸分解代谢, 使得二级大曲酸度显著低于一级大曲。【结论】本研究在基因水平上研究了不同质量等级大曲酶活和酸度差异的微生物基础, 可为建立完善的大曲质量评价体系以及理性地调控群落功能提供理论支撑。

关键词: 中温大曲; 质量等级; 宏基因组学; 微生物群落结构与功能

Metagenomics unveils the microbiome heterogeneity of medium-temperature Daqu with different quality grades

LIU Wenhui^{1,2,3}, CHAI Lijuan^{1,2*}, ZHANG Liqiang³, LU Zhenming^{1,2}, ZHANG Xiaojuan^{1,2}, WANG Songtao^{3,4}, SHEN Caihong⁴, SHI Jinsong⁵, XU Zhenghong^{1,2,4*}

1 National Engineering Research Center for Cereal Fermentation and Food Biomanufacturing, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu, China

2 School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu, China

3 Luzhou Pinchuang Technology Company Limited, Luzhou 646000, Sichuan, China

4 National Engineering Research Center of Solid-state Brewing, Luzhou 646000, Sichuan, China

5 School of Life Sciences and Health Engineering, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu, China

Abstract: [Objective] Medium-temperature Daqu is the saccharifying, fermentative, and aroma-producing agent used in the brewing of strong-flavor Baijiu. The current quality evaluation of medium-temperature Daqu mainly depends on sensory and physicochemical characteristics. Previous studies have employed amplicon sequencing to preliminarily explore the relationship between the quality grade of Daqu and the composition of microbial community. However, little is known about the impacts of microbial community functions on the quality of Daqu. [Methods] We employed metagenomics to analyze and compare microbial community composition and potential functions of medium-temperature Daqu with different quality grades. We then analyzed the activities and the gene abundance of key enzymes involved in lactate and acetate metabolism. [Results] The fungal community structure was different between two Daqu samples. Higher relative abundance of filamentous fungi, represented by *Aspergillus* (21.6%), *Rasamsonia* (6.8%), *Paecilomyces* (5.0%), and *Talaromyces* (4.4%), were observed in the first-grade Daqu (Grade_1). The relative abundance of genes involved in environmental information processing and cellular processes in Grade_1 was significantly higher than that in the second-grade Daqu (Grade_2). In Grade_1, *Hymenobacter* and *Aspergillus* contributed to the

higher gene abundance of alpha-amylase, resulting in significantly higher liquefying activity. In Grade_2, *Lichtheimia* (11.8%), *Rhizopus* (13.4%), and *Pichia* (7.2%), and lactic acid bacteria such as *Companilactobacillus*, *Weissella*, and *Limosilactobacillus* had higher relative abundance. Moreover, the genes involved in metabolism such as carbohydrate metabolism, energy metabolism, and nucleotide metabolism had higher relative abundance in Grade_2. The more abundant lactic acid bacteria in Grade_2 was conducive to the higher gene abundance of alcohol dehydrogenase and *Saccharopolyspora*, *Staphylococcus*, *Aspergillus*, and *Thermoactinomyces* provided a higher gene abundance of carboxylesterase, enhancing the fermentative and esterifying activities, respectively. Furthermore, more lactic acid bacteria in Grade_2 might produce more lactate dehydrogenase to degrade lactic acid, and the higher gene abundance of acetate metabolism-related enzymes could promote acetate catabolism, which led to the significantly lower acidity in Grade_2 than in Grade_1. **[Conclusion]** We analyzed the microbial community functions of medium-temperature Daqu with different quality grades at the gene level and explored the potential microorganisms contributing to the differences in enzyme activities and acidity. The findings can underpin the establishment of a comprehensive Daqu quality evaluation system and the rational regulation of community functions.

Keywords: medium-temperature Daqu; quality grade; metagenomics; microbial community structure and function

作为中国白酒酿造中广泛使用的糖化发酵剂和生香剂,大曲可为白酒生产提供多样的微生物菌群、丰富的酶类和风味物质及其前体^[1]。根据发酵顶温的不同,大曲可分为高温大曲(60–70 °C)、中温大曲(50–60 °C)和低温大曲(40–50 °C)^[2–3]。传统大曲的发酵过程在开放环境中自发进行,来自原料和环境的微生物在大曲微生态系统内不断演替,同时伴随着代谢产物和酶类的积累^[3]。目前大曲生产仍主要依靠经验对发酵过程进行控制,由于发酵过程的自发性,同样的原料、生产工艺和发酵环境,也可能生产出质量差异明显的大曲^[1,4–5]。大曲的质量关系着白酒的风味和品质,行业内素有“曲为酒之骨”的经验总结,因此,建立科学的大曲质量评价和等级划分标准在白酒生产中具有重要作用。然而,目前大曲质量评价主要依赖于感官和理化特征,包括外观、断面、香气、水分含量、酸度、淀粉含量和酶活等,其中,感官评价

方法较主观且需要一定的经验积累,不能满足白酒酿造过程稳定可控的预期目标^[6–8]。

近年来,已有研究探索了微生物群落组成和多样性与大曲质量的相关关系^[6–9]。例如,向港兴等^[9]采用扩增子测序分析了2种等级(优级、一级)浓香型大曲的微生物群落结构差异,发现它们的细菌群落结构较为相似,而优级曲的嗜热子囊菌属(*Thermoascus*)和曲霉属(*Aspergillus*)相对丰度显著高于一级曲,一级曲的未分类曲霉科(*unclassified Aspergillaceae*)相对丰度显著高于优级曲。丁芳等^[6]采用扩增子测序比较了3种不同等级高温大曲微生物群落,发现芽孢杆菌属(*Bacillus*)、葡萄球菌属(*Staphylococcus*)和罗萨氏菌属(*Rasamsonia*)等是造成不同等级大曲微生物群落结构差异的重要微生物。Fan等^[7]采用扩增子测序研究了3种(优级、一级和普通级)芝麻香型白酒大曲的微生物群落,发现优级和一级大曲的群落结构相似,

且与普通级有很大差异。Zhang 等^[8]采用 PacBio 测序比较了优级和普通级高温大曲的微生物群落,发现优级大曲的优势属为慢生芽孢杆菌属(*Lentibacillus*)、伯克霍尔德菌属(*Burkholderia*)、糖多孢菌属(*Saccharopolyspora*)、嗜热子囊菌属和罗萨氏菌属,普通级大曲的优势属为葡萄球菌属、岩石芽孢杆菌属(*Scopulibacillus*)和 *Chromocleista*。这些研究为探索影响大曲质量的微生物因素提供了帮助,但是并未深入解析微生物群落功能对大曲质量的影响。扩增子测序主要用于探究微生物群落结构,其序列信息来自特定的基因组区域,对微生物群落功能的了解有限^[10],仅能借助 PICRUSt 和 Tax4Fun 等软件间接分析菌群功能。系统研究微生物群落的功能,需要宏基因组、宏转录组等测序技术。

因此,本研究采用宏基因组学解析不同质量等级大曲的微生物群落组成和潜在功能的差异性,尤其是从群落功能视角研究大曲酶活和酸度等重要理化性质的微生物基础,以期为建立完善的质量评价体系以及理性调控群落功能提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

本文的研究对象为浓香型白酒酿造中最常用的一级大曲(Grade_1)和二级大曲(Grade_2),一级大曲的质量优于二级大曲。两种大曲均采集于泸州老窖股份有限公司,每种大曲各随机选取 10 块大曲作为平行样,每块大曲粉碎后为 1 个生物学重复样本,共计 20 个样本,采样时间为 2020 年 12 月。两种大曲来源于同一批次生产的中温大曲。

1.2 大曲理化指标检测

大曲理化指标(水分、可滴定酸度、淀粉、糖化力、液化力、发酵力和酯化力)按照 QB/T

4257—2011《酿酒大曲通用分析方法》规定的方法检测。

1.3 总 DNA 提取、文库构建及高通量测序

采用 Omega 公司的 Soil DNA Kit (Omega Bio-Tek, Norcross)提取各样本的总 DNA,并对提取的 DNA 进行检测和定量,调整 DNA 溶液浓度。采用标准的 Illumina TruSeq DNA 文库制备流程(Illumina TruSeq DNA Sample Preparation Guide, Illumina)构建测序文库。鸟枪法宏基因组测序(Shotgun metagenomics)由上海派森诺生物科技股份有限公司完成,测序平台为 Illumina NovaSeq (Illumina),测序策略为双端 150 bp。

20 个大曲样品的宏基因组测序原始数据(raw data)已存储于国家基因组科学数据中心(National Genomics Data Center, <https://ngdc.cnca.ac.cn/gsa/>),编号: CRA010226。

1.4 生物信息学分析

按照已报道的方法进行宏基因组测序数据分析^[11]。简而言之,原始数据(raw data)经筛选和过滤,去除低质量序列后获得有效数据(clean data)进行后续分析。去除宿主后,采用 Kaiju 软件的 Greedy 模式完成基于 Reads 的物种注释^[12]。同时,有效数据经过 *de novo* 组装、去冗余获得非冗余重叠群序列(non-redundant contigs),然后基于非冗余重叠群序列进行基因和蛋白质预测^[13]。蛋白序列聚类获得非冗余蛋白序列集(uniprotein set),各蛋白序列的丰度与其对应的基因序列一致,采用每千个碱基的转录每百万映射读取的转录本(transcripts per kilobase of exon model per million mapped reads, TPM)计算丰度。每个非冗余蛋白序列经与 KEGG、NCBI NR 数据库匹配分别获得其功能、物种注释信息。最后,根据每个非冗余蛋白序列的功能和分类学信息总结微生物群落物种与功能的对应关系^[14]。

1.5 数据分析与可视化

两种大曲之间每项理化指标、每个物种相对丰度以及每个代谢路径和酶基因 TPM 的差异检验均采用 *T* 检验,显著性水平为 0.05。物种、酶基因的堆积柱状图均采用 Origin 2022b 软件绘制 (<https://www.originlab.com/>)。基于 Hellinger 距离矩阵的微生物群落组成主坐标分析(principal co-ordinates analysis, PCoA)采用 R 语言 (<https://www.r-project.org/>) 的 *vegan*、*ggplot2* 包完成,同时其 Anosim 分析(analysis of similarities, 相似性分析)采用 R 语言的 *vegan* 包完成,置换次数为 999 次。微生物群落和功能组成的线性判别分析(linear discriminant analysis effect size, LEfSe)均采用“生科云”(<https://bioincloud.tech/>)完成,显著性水平为 0.05,线性判别分析得分(linear discriminant analysis score, LDA)的阈值为 3.0。

2 结果与讨论

2.1 不同质量等级大曲的感官与理化特征

传统大曲质量等级鉴定以感官和理化特征为主要判别指标。整体上,一级大曲穿衣均匀,无裂口,表面光滑,曲体泡气整齐,曲香浓郁,曲皮厚度较小(≤ 0.5 cm);二级大曲穿衣不匀,有轻微裂口,表面欠光滑,曲体欠泡气,曲

香较浓,曲皮厚度较大(0.5–1.0 cm)^[15]。从主要理化指标来看,一级大曲的酸度、糖化力和液化力显著高于二级大曲($P \leq 0.05$),而二级大曲的淀粉含量、发酵力和酯化力较高,但与一级大曲无显著性差异($P > 0.05$) (表 1)。

2.2 不同质量等级大曲的微生物群落组成

大曲发酵过程中网罗了来自原料和环境的微生物,这些微生物的代谢活动直接或间接影响着大曲的风味和酶活力等理化特征。采用宏基因组学分析了 2 种等级大曲的微生物群落组成,共获得 219.7 Gb 原始数据,质控后得到 217.6 Gb 有效数据用于后续分析。去除宿主序列后进行物种分类学分析,共注释到 547 个目(4 477 个属、22 718 个种),且平均相对丰度 top 10 优势目(top 20 优势属、top 20 优势种)的累计相对丰度为 94.2% (82.7%、57.1%) (图 1)。在目水平,优势类群(平均相对丰度 $> 4.5\%$)主要分布在散囊菌目(*Eurotiales*)、毛霉菌目(*Mucorales*)、酵母菌目(*Saccharomycetales*)、乳杆菌目(*Lactobacillales*)和芽孢杆菌目(*Bacillales*) (图 1A、1B)。优势真菌属(平均相对丰度 $> 5.1\%$)包括曲霉属(*Aspergillus*)、横梗霉属(*Lichtheimia*)、根霉属(*Rhizopus*)、罗萨氏菌属(*Rasamsonia*)和毕赤酵母属(*Pichia*) (图 1C); 优势细菌属(平均相对丰度 $> 2.1\%$)包括伴生乳杆菌属(*Companilactobacillus*)、魏斯氏菌属(*Weissella*)、

表 1 两种大曲的理化指标

Table 1 The physicochemical parameters of two kinds of Daqu

Physicochemical parameters	First-grade Daqu (Grade_1)	Second-grade Daqu (Grade_2)
Moisture (%)	13.44±0.31	13.62±0.25 (NS)
Titrate acidity (mmol/10 g)	0.81±0.08*	0.63±0.06
Starch content (%)	57.43±4.35	59.17±3.99 (NS)
Saccharifying activity (mg/(g·h))	770.57±46.15*	623.85±73.36
Liquefying activity (g/(g·h))	0.85±0.03*	0.74±0.04
Fermentative activity (g/(0.5 g·72 h))	0.56±0.03	0.60±0.04 (NS)
Esterifying activity (mg/(50 g·7 d))	633.11±45.50	691.15±77.58 (NS)

*: Significant difference, and NS (not significant) represented no significant difference (significance level: 0.05).

芽孢杆菌属 (*Bacillus*) 和黏液乳杆菌属 (*Limosilactobacillus*) (图 1D), 与已报道的中温大曲菌群结构的宏基因组分析结果基本一致^[11,14]。

推测虽然大曲在开放环境下生产, 但发酵过程中的高温驱动了菌群“净化”^[16], 有助于保障其批次间群落组成的稳定性^[17]。

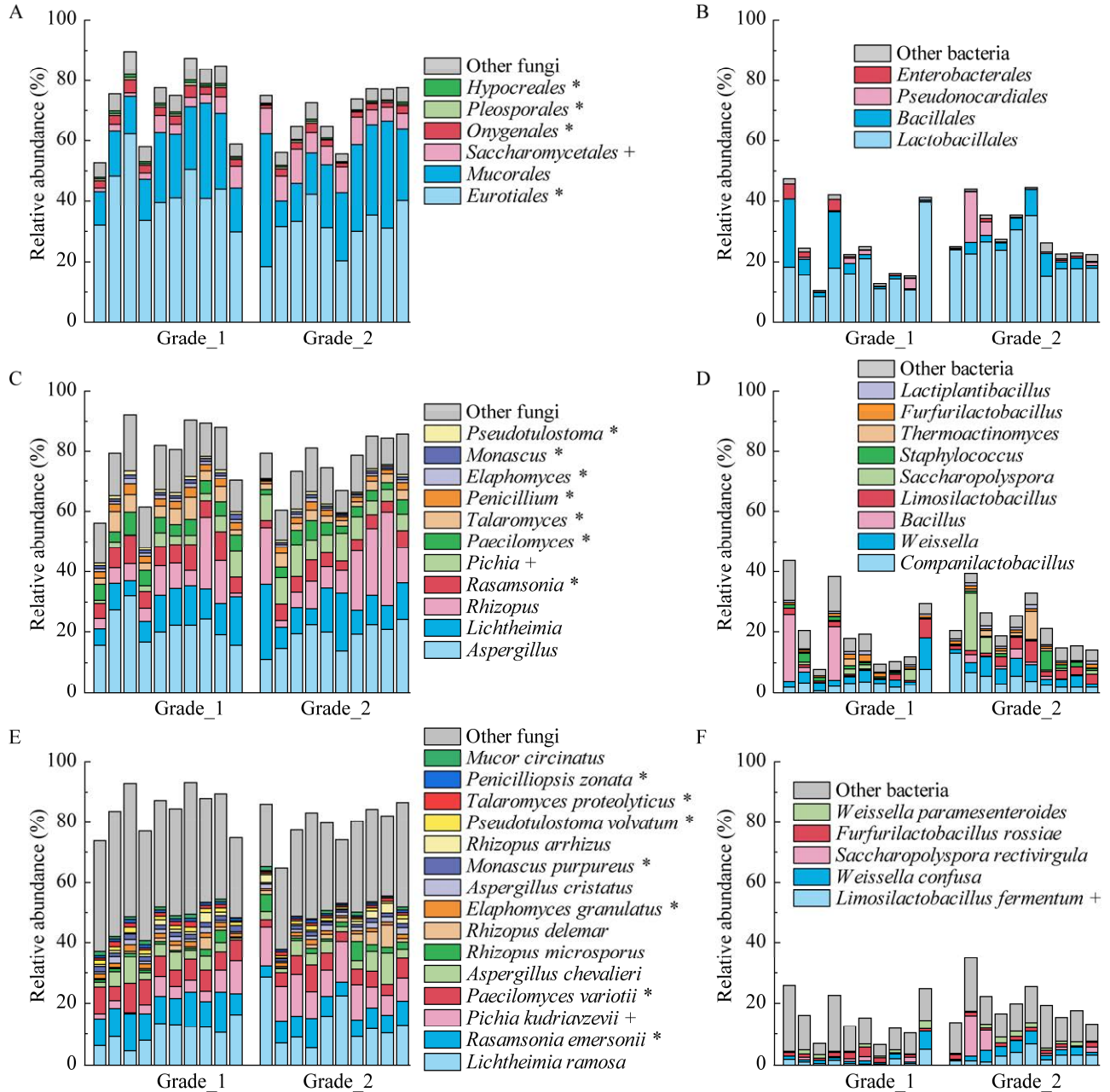


图 1 不同分类学水平上两种大曲的微生物群落组成

Figure 1 Microbial community compositions at different levels of two kinds of Daqu. Fungal (A) and bacterial (B) community at the order level, fungal (C) and bacterial (D) community at the genus level, as well as fungal (E) and bacterial (F) community at the species level; the mark * represented the microbial group with significantly higher relative abundance in Grade_1, and the mark + represented the microbial group with significantly higher relative abundance in Grade_2 (significance level: 0.05).

整体上看, 2 种等级大曲的微生物均以真菌为主(图 1), 群落组成显著差异[$P=0.002$, 相似性分析(analysis of similarities, Anosim)] (图 2A)。一级大曲(42.2%)中散囊菌目相对丰度显著高于二级大曲(31.3%), 主要由于曲霉属(一级: 21.6%、二级: 18.8%)相对丰度较高, 以及罗萨氏菌属(6.8%, 4.5%)、拟青霉属(*Paecilomyces*, 5.0%, 3.7%)和篮状菌属(*Talaromyces*, 4.4%, 2.7%)等相对丰度显著较高($P\leq 0.05$) (图 1A、1C)。这些丝状真菌也是 LEfSe 分析中一级大曲的标志性真菌微生物(图 2B), 主要包括谢瓦曲霉菌(*Aspergillus chevalieri*)、冠突曲霉菌(*Aspergillus cristatus*)、埃默森罗萨氏菌(*Rasamsonia emersonii*)、宛氏拟青霉菌(*Paecilomyces variotii*)和解蛋白篮状菌(*Talaromyces proteolyticus*)等(图 1E), 它们通常具有良好的耐热、抗旱性能, 能分泌多种酶类, 如淀粉酶、蛋白酶等, 也是风味化合物的生产者^[18]。已有研究表明多种丝状真菌是大曲发酵中后期的转录活性群体^[11], 推测一级大曲中丰度多样的丝状真菌可能促进了其更彻底地完成自发发酵过程, 并消耗更多的淀粉、蛋白质, 合成丰富的代谢物和水解酶类, 使其曲香浓厚, 且具有较高

的糖化力和液化力(表 1)。二级大曲中毛霉菌目(二级: 24.0%、一级: 18.9%, $P>0.05$)和酵母菌目(7.3%, 3.4%, $P\leq 0.05$)相对丰度较高, 在属水平, 横梗霉属(11.8%, 10.0%, $P>0.05$)、根霉属(13.4%, 8.1%, $P>0.05$)和毕赤酵母属(7.2%, 3.2%, $P\leq 0.05$)的相对丰度较高(图 1A、1C)。其中, 毕赤酵母属是二级大曲的标志性真菌微生物(图 2B)。横梗霉属、根霉属和毕赤酵母属[主要为总状横梗霉菌(*Lichtheimia ramosa*)、小孢根霉菌(*Rhizopus microspores*)、戴尔根霉菌(*Rhizopus delemar*)和库德里阿兹威毕赤酵母菌(*Pichia kudriavzevii*)] (图 1E)均是曲霉发酵初期的活跃微生物^[11]。

二级大曲的细菌总相对丰度高于一级大曲, 但差异不显著($P>0.05$), 且优势物种相对丰度在 2 种大曲中均无显著差异($P>0.05$), 仅发酵黏液乳杆菌(*Limosilactobacillus fermentum*)的相对丰度在二级大曲中显著较高($P\leq 0.05$) (图 1B、1D、1F)。整体上, 二级大曲中乳酸菌类群的相对丰度普遍高于一级大曲, 如伴生乳杆菌属(二级: 4.7%、一级: 3.1%, $P>0.05$)、魏斯氏菌属(3.7%, 3.1%, $P>0.05$)和黏液乳杆菌属(2.7%, 1.5%, $P>0.05$)等, 其中黏液乳杆菌属是二级大曲的标

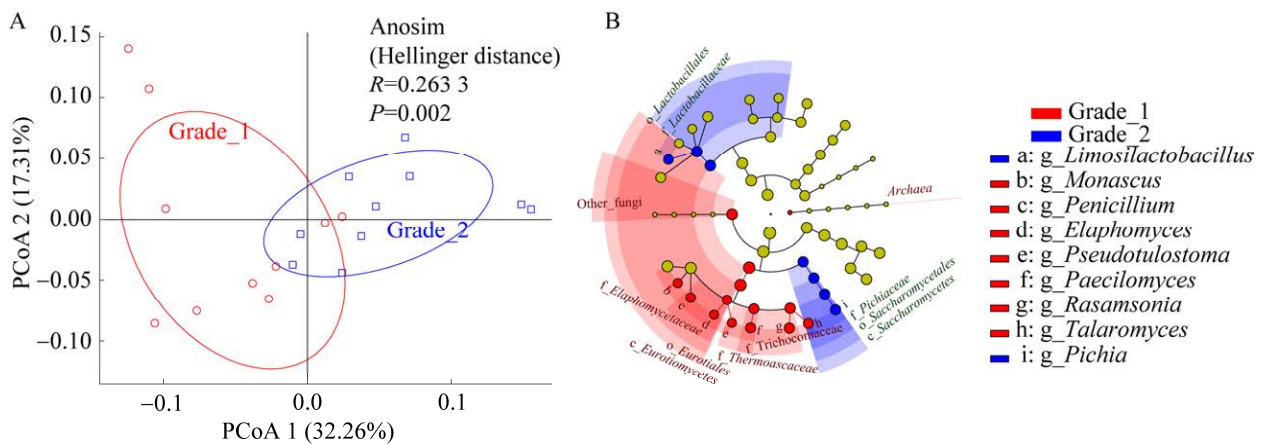


图 2 基于属水平微生物群落组成的 PCoA 分析(A)和基于 top20 属的 LEfSe 分析(LDA \geq 3.0) (B)
 Figure 2 PCoA of microbial community composition at the genus level (A) and LEfSe of major (top 20) microbial community composition at the genus level with LDA \geq 3.0 (B).

志性细菌微生物(图 2B)。乳酸菌类通常可代谢产生乳酸、乙醇等化合物,其营造的酸性环境可抑制病原菌、腐败菌或产毒菌的繁殖^[19]。二级大曲中乳酸菌类群相对丰度较高,但其可滴定酸度显著低于一级大曲(表 1),推测乳酸、乙酸等代谢相关的酶通常为可逆酶,乳酸菌即可合成也能分解乳酸、乙酸,成品大曲中乳酸菌类群可能倾向于分解代谢。乳酸菌和酵母菌是白酒发酵中的优势群体,过多的乳酸菌可能会抑制酵母菌的生长和乙醇代谢^[20-21]。此外,一级大曲的部分样本中存在较高相对丰度的芽孢杆菌属(图 1D),主要是地衣芽孢杆菌(*Bacillus licheniformis*)和枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*),芽孢杆菌属是大曲中普遍检出的微生物类群,它具有优良的耐热抗早能力,且可产淀粉酶、糖化酶和蛋白酶等^[22]。宏转录组分析显示,大曲发酵中后期细菌群落整体活性较低^[11],而本研究中的 2 种大曲的细菌群落整体差异也较小,因此,推测细菌群落不是造成大曲质量等级差异的主要因素。

2.3 不同质量等级大曲的微生物群落潜在功能

去宿主序列后的有效数据共组装得到 1 728 698 条非冗余重叠群序列,其 N50 长度为 1 171 bp,进一步预测得到 744 542 条非冗余蛋白序列。其中,191 287 条非冗余蛋白序列共注释到 10 951 个 KO (KEGG orthology)。结果显示,一级大曲中与环境信息处理 (environmental information processing) 和细胞过程 (cellular processes) 相关途径的相对丰度普遍显著高于二级大曲(图 3B),且它们基本是 LEfSe 分析中一级大曲的标志性途径(图 3A)。一级大曲中具有更高相对丰度的运输和分解代谢(transport and catabolism)、细胞生长和死亡(cell growth and death)和细胞运动(cell motility),说明一级大曲的微生物群落可能具有较强的生长代谢潜力和

新老更替速率;更高相对丰度的真核生物细胞群落 (cellular community-eukaryotes) 与一级大曲中真菌类群相对丰度普遍较高相符。二级大曲中与代谢 (metabolism) 相关途径的相对丰度较高,如碳水化合物代谢 (carbohydrate metabolism)、能量代谢 (energy metabolism) 和核苷酸代谢 (nucleotide metabolism) 等(图 3C),其中碳水化合物代谢、核苷酸代谢和其他氨基酸的代谢 (metabolism of other amino acids) 是 LEfSe 分析中二级大曲的标志性途径(图 3A)。

2.4 不同质量等级大曲关键酶的微生物来源

由于酶活、酸度是区分大曲质量等级的重要理化指标(表 1),且乳酸、乙酸为大曲发酵过程中的主要有机酸^[23],本研究聚焦大曲酶活、乳酸和乙酸代谢相关的关键酶,在基因水平上研究不同质量等级大曲功能差异的微生物基础(图 4-8)。

液化力用于考察大曲粗酶分解淀粉的能力。参与淀粉水解的酶主要有糖原磷酸化酶 (glycogen phosphorylase, EC:2.4.1.1)、 α -淀粉酶 (alpha-amylase, EC: 3.2.1.1)、 β -淀粉酶 (beta-amylase, EC: 3.2.1.2) 和 γ -淀粉酶(也称葡萄糖淀粉酶, glucoamylase, EC: 3.2.1.3) 等。一级大曲中 α -淀粉酶基因的丰度 (TPM) 显著较高 ($P \leq 0.05$),二级大曲中糖原磷酸化酶、 γ -淀粉酶基因的 TPM 值较高 ($P > 0.05$) (图 4A-4C),未注释到与 β -淀粉酶相关的非冗余蛋白序列。根据各酶对应非冗余蛋白序列的物种注释信息,糖原磷酸化酶主要来源于曲霉属、根霉属等真菌,以及克雷伯氏菌属 (*Klebsiella*)、未分类乳杆菌科 (unclassified *Lactobacillaceae*)、未分类芽孢杆菌科 (unclassified *Bacillaceae*) 和魏斯氏菌属等细菌(图 4A); α -淀粉酶主要源自曲霉属、根霉属等真菌以及薄层菌属 (*Hymenobacter*)、克雷伯氏菌属

等细菌(图 4B); γ -淀粉酶主要来源于真菌类微生物, 如曲霉属、根霉属、威克汉姆酵母属(*Wickerhamomyces*)、嗜热真菌属(*Thermomyces*)和棒孢酵母属(*Clavispora*)等(图 4C)。糖原磷酸化酶、淀粉酶均来源广泛^[24-25], 曲霉属、根霉属

是中温大曲中负责降解淀粉的主要微生物, 这与文献报道一致^[18,26], 它们也是中温大曲的主要真菌类群(图 1C)。一级大曲中 α -淀粉酶基因丰度显著较高, 功能预测显示它主要由薄层菌属、曲霉属、未分类细菌(unclassified bacteria)和芽孢

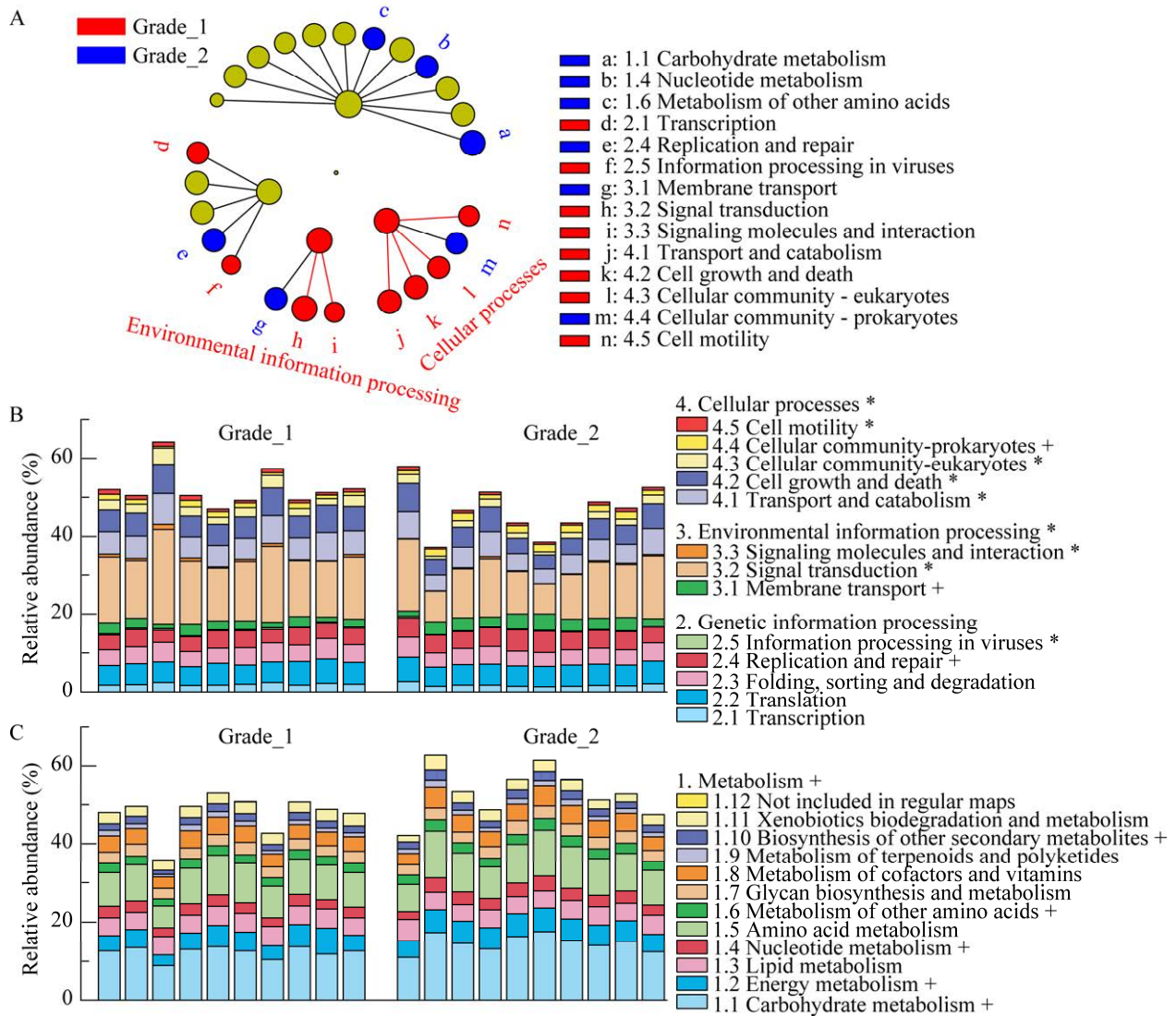


图 3 KEGG pathway L2 水平上两种大曲的微生物群落功能 LefSe 分析(LDA \geq 3.0) (A)和功能组成(B 和 C)

Figure 3 LefSe with LDA \geq 3.0 (A) and compositions (B and C) of microbial community potential function of two kinds of Daqu at KEGG pathway L2 level. Pathways related to genetic information processing, environmental information processing, and cellular processes (B), and pathways related to metabolism (C). *: The pathway with significantly higher relative abundance in Grade_1, and the mark + represented the pathway with significantly higher relative abundance in Grade_2 (significance level: 0.05).

杆菌属等提供(图 4B), 这可能促进了一级大曲液化力显著较高(表 1)。糖原磷酸化酶和 γ -淀粉酶主要由曲霉属和根霉属等产生(图 4A、4C), 2 种大曲中曲霉属和根霉属相对丰度无显著差异($P>0.05$) (图 1C), 使得 2 种大曲的糖原磷酸化酶和 γ -淀粉酶基因丰度无显著差异($P>0.05$)。

糖化力用于评估大曲粗酶将淀粉水解为葡萄糖的能力, 该过程涉及的关键酶不仅包括以淀粉为底物的 α - β - γ -淀粉酶, 也包含能作用于淀粉水解中间产物的多种酶类, 其中 TPM 较高的是以麦芽糖、蔗糖为底物的 α -葡萄糖苷酶(alpha-glucosidase, EC: 3.2.1.20) (图 4D)。二级大曲中 α -葡萄糖苷酶 TPM 显著较高, 主要源自曲霉属和细菌, 如魏斯氏菌属、伴生乳杆菌属和葡萄球菌属等。但是, 二级大曲的糖化力显著低于一级大曲($P\leq 0.05$) (表 1), 可能因为二级大曲中

α -淀粉酶基因丰度较低, 水解淀粉为麦芽糖的能力较低, 使得 α -葡萄糖苷酶的底物浓度较低; 淀粉水解为葡萄糖的途径众多, 涉及的水解酶类众多, α -葡萄糖苷酶并不能完全代表糖化力。另外, 在宏基因组学分析的基础上, 群落的代谢功能需要更多的实验验证, 如更精确的碳水化合物酶类定量分析、酶基因的转录水平分析等。

发酵力是根据微生物发酵产 CO_2 的量来评估大曲微生物的产酒能力。涉及的关键酶主要有乙醇脱氢酶(alcohol dehydrogenase, EC: 1.1.1.1) 和乙醇脱氢酶 NADP^+ (alcohol dehydrogenase NADP^+ , EC: 1.1.1.2)。乙醇脱氢酶主要源于曲霉属、黏液乳杆菌属、明串珠菌属(*Leuconostoc*)和未分类乳杆菌目(unclassified *Lactobacillales*)等, 而乙醇脱氢酶 NADP^+ 主要源于根霉属、曲霉属和葡萄球菌属(*Staphylococcus*)等(图 5A、5B)。

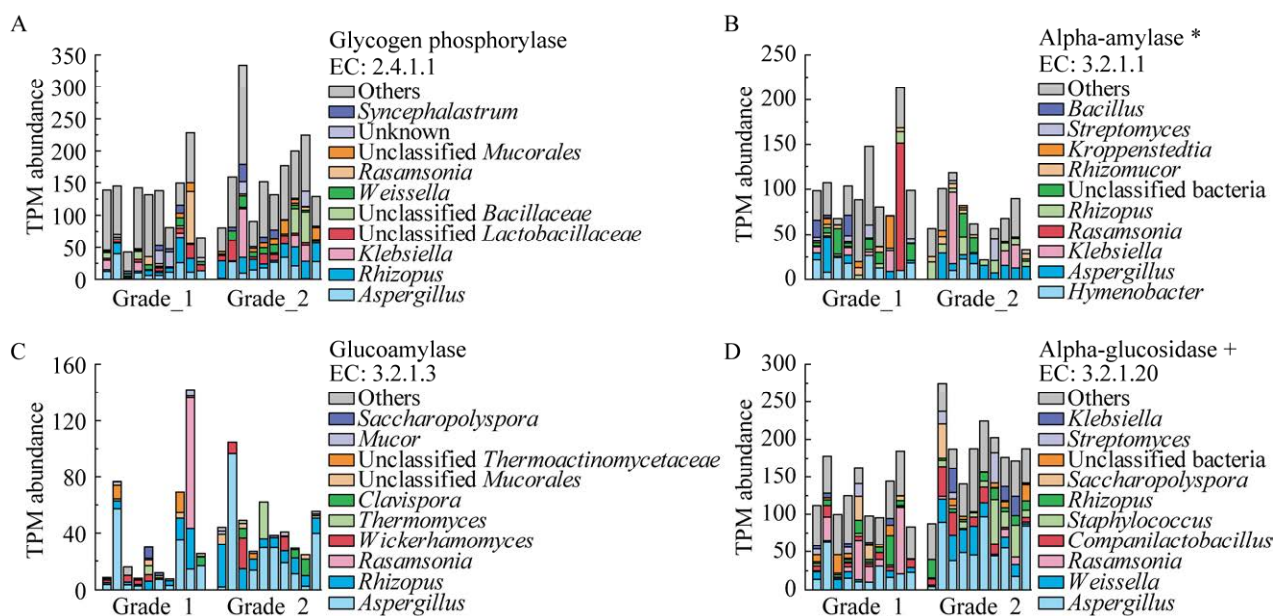


图 4 与液化力、糖化力相关酶的基因丰度及微生物来源

Figure 4 The TPM abundances and microbial sources of key enzymes related to liquefying and saccharifying activities. Glycogen phosphorylase (EC: 2.4.1.1) (A), alpha-amylase (EC: 3.2.1.1) (B), glucoamylase (EC: 3.2.1.3) (C), and alpha-glucosidase (EC: 3.2.1.20) (D). *: The enzyme with significantly higher TPM abundance in Grade_1, and the mark + represented the enzyme with significantly higher TPM abundance in Grade_2 (significance level: 0.05).

二级大曲中更高相对丰度的乳酸菌类群促进乙醇脱氢酶基因丰度显著较高($P \leq 0.05$) (图 1D, 5A), 这可能使得二级大曲具有较高的发酵力(表 1)。

酯化力用于考察大曲催化己酸和乙醇酯化反应生成己酸乙酯的能力。乙酯类物质通常可由 2 条途径合成, 一是由醇乙酰基转移酶(alcohol O-acetyltransferase, EC: 2.3.1.84)催化的乙酰基转移反应, 二是由羧酸酯酶(carboxylesterase, EC: 3.1.1.1)催化的缩合反应^[27]。大曲中乙酰基转移酶基因丰度极低, 且其非冗余蛋白序列仅注释到威克汉姆酵母属(图 5C)。羧酸酯酶则主要源于曲霉属和细菌, 包括糖多孢菌属(*Saccharopolyspora*)、葡萄球菌属、高温放线菌属(*Thermoactinomyces*)、糠乳杆菌属(*Furfurilactobacillus*)、伴生乳杆菌属和芽孢杆菌属等(图 5D)。二级大曲具有较高基因丰度的羧

酸酯酶($P > 0.05$), 且主要由糖多孢菌属、葡萄球菌属、曲霉属和高温放线菌属等提供, 这可能使其具有了较高的酯化力($P > 0.05$) (表 1)。

乳酸代谢过程涉及到的关键酶主要是 D-/L-乳酸脱氢酶(细胞色素)(D-/L-lactate dehydrogenase cytochrome, EC: 1.1.2.4/EC: 1.1.2.3)和 D-/L-乳酸脱氢酶(D-/L-lactate dehydrogenase, EC: 1.1.1.28/EC: 1.1.1.27)。D-/L-乳酸脱氢酶(细胞色素)主要来源于真菌, 如曲霉属和根霉属等(图 6A、6C), 而 D-/L-乳酸脱氢酶主要来源于乳酸菌类等细菌, 如伴生乳杆菌属、魏斯氏菌属、未分类乳杆菌科和明串珠菌属等(图 6B、6D)。大曲发酵过程中, 酸度先升高后降低, 在发酵结束时维持在较低水平^[11], 发酵后期酸度降低原因可能是有机酸的逐渐降解, 其中乳酸降解可能更依赖于 D-/L-乳酸脱氢酶, 因为其丰度明显高于 D-/L-乳酸脱氢酶(细胞色素)(图 6)。

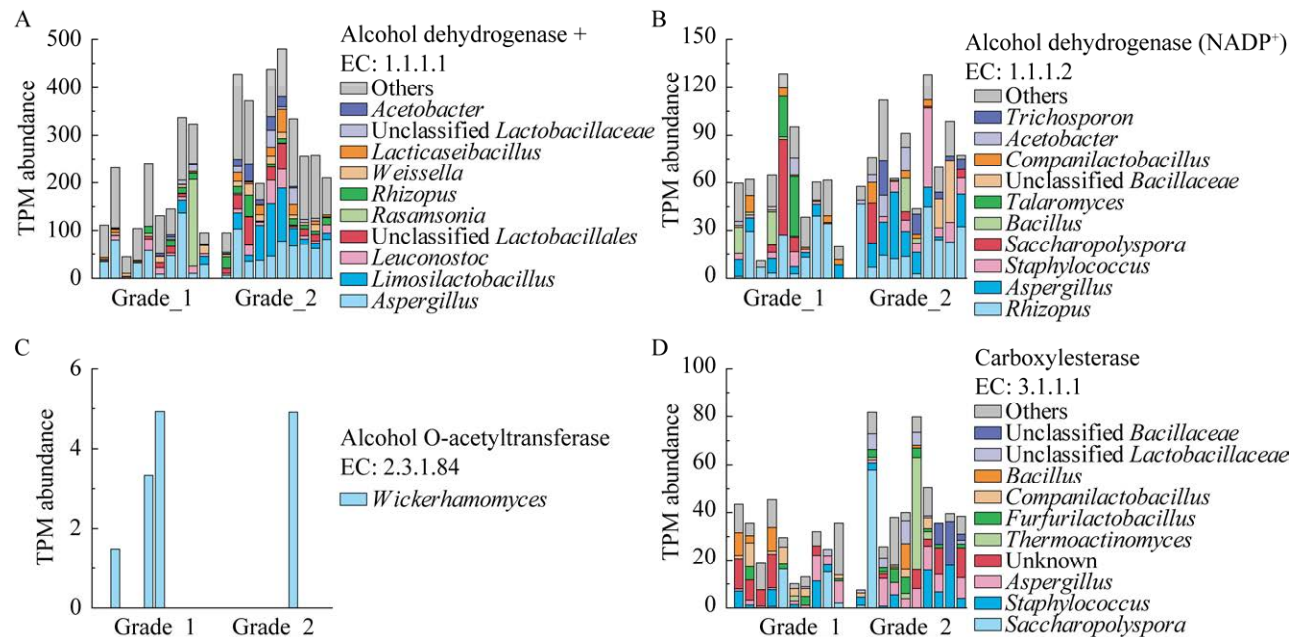


图 5 与发酵力、酯化力相关酶的基因丰度及微生物来源

Figure 5 The TPM abundances and microbial sources of key enzymes related to fermentative and esterifying activities. Alcohol dehydrogenase (EC: 1.1.1.1) (A), alcohol dehydrogenase (NADP^+) (EC: 1.1.1.2) (B), alcohol O-acetyltransferase (EC: 2.3.1.84) (C), and carboxylesterase (EC: 3.1.1.1) (D). +: The enzyme with significantly higher TPM abundance in Grade_2 (significance level: 0.05).

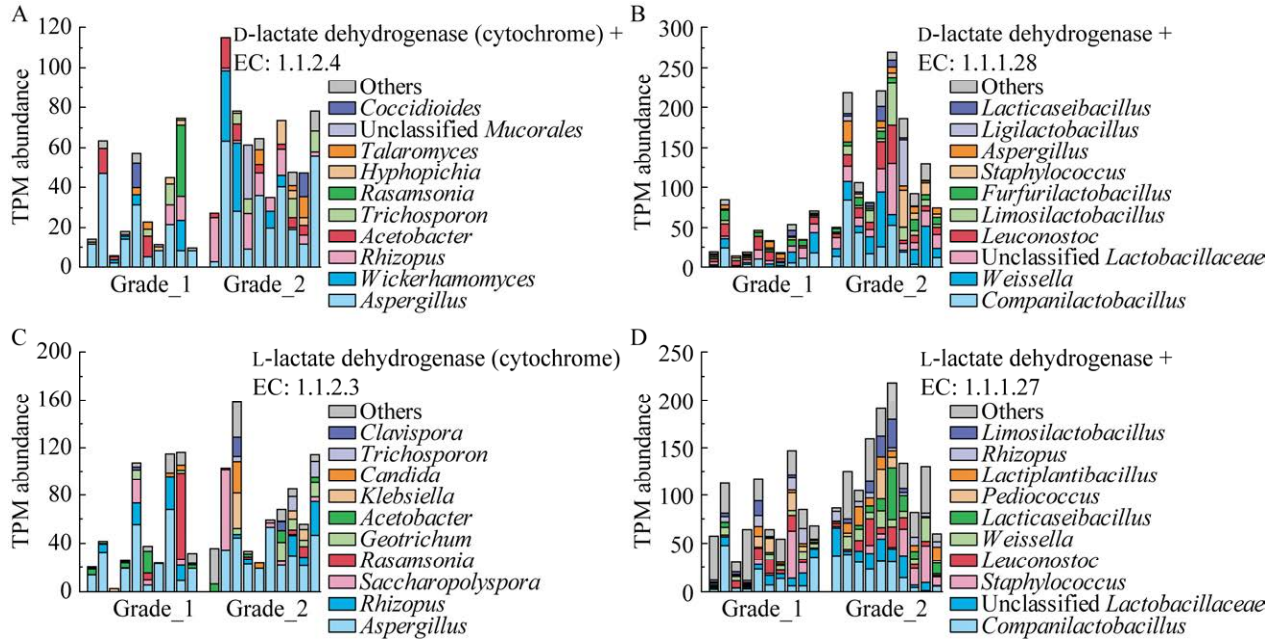


图 6 与乳酸代谢相关酶的基因丰度及微生物来源

Figure 6 The TPM abundances and microbial sources of key enzymes related to lactic acid metabolism. D-lactate dehydrogenase (cytochrome) (EC: 1.1.2.4) (A), D-lactate dehydrogenase (EC: 1.1.1.28) (B), L-lactate dehydrogenase (cytochrome) (EC: 1.1.2.3) (C), and L-lactate dehydrogenase (EC: 1.1.1.27) (D); The mark + represented the enzyme with significantly higher TPM abundance in Grade_2 (significance level: 0.05).

整体上,二级大曲中 4 种乳酸脱氢酶基因的丰度普遍高于一级大曲,较高丰度的乳酸脱氢酶能分解更多的 D-/L-乳酸,这可能是二级大曲中酸度较低的原因之一(表 1)。因此,推测二级大曲中较多的乳酸菌类群分泌了更多的乳酸脱氢酶,尤其是 D-/L-乳酸脱氢酶,导致其乳酸降解、酸度降低。

乙酸可由乙醇氧化生成,其中涉及的关键酶主要有乙醇脱氢酶、乙醇脱氢酶 NADP^+ 、乙醛脱氢酶 NAD^+ (aldehyde dehydrogenase NAD^+ , EC: 1.2.1.3)、乙醛脱氢酶(aldehyde dehydrogenase, EC: 1.2.1.-)和乙醛脱氢酶 NAD(P)^+ [(aldehyde dehydrogenase NAD(P)^+ , EC: 1.2.1.5)] (图 5A、5B, 图 7A–7C)。乙醛脱氢酶 NAD^+ 主要来源于根霉属和曲霉属等真菌,以及葡萄球菌属、芽孢杆菌

属和糖多孢菌属等细菌(图 7A); 乙醛脱氢酶全部来自于细菌,如葡萄球菌属、醋杆菌属 (*Acetobacter*)和糖多孢菌属等(图 7B); 乙醛脱氢酶 NAD(P)^+ 则全部源自真菌,如曲霉属、横梗霉属、根霉属和篮状菌属等(图 7C)。另外,乙酸也可以由糖类逐步合成,其中重要的中间产物有丙酮酸、乙酰磷酸和乙酰辅酶 A 等。丙酮酸脱氢酶(醌) [pyruvate dehydrogenase (quinone), EC: 1.2.5.1]能直接催化丙酮酸生成乙酸,其全部由细菌少量产生(图 7D)。催化乙酰磷酸生成乙酸的酶主要是乙酸激酶(acetate kinase, EC: 2.7.2.1)和酰基磷酸酶(acylphosphatase, EC: 3.6.1.7),两者均主要源于细菌,如明串珠菌属、伴生乳杆菌属和黏液乳杆菌属等产生前者,黏液乳杆菌属、糖多孢菌属和葡萄球菌属等产生后者(图 7E、

7F)。乙酰辅酶 A 是活化了的乙酸, 它与乙酸能够相互转化, 且主要有 4 种酶催化该可逆反应, 即乙酰辅酶 A 水解酶(acetyl-CoA hydrolase, EC: 3.1.2.1)、琥珀酰辅酶 A-乙酰辅酶 A 转移酶(succinyl-CoA: acetate CoA-transferase, EC: 2.8.3.18)、丙酰辅酶 A 转移酶(propionate CoA-transferase, EC: 2.8.3.1)和乙酰辅酶 A 合成

酶(acetyl-CoA synthetase, EC: 6.2.1.1) (图 8)。乙酰辅酶 A 水解酶主要由真菌产生, 如曲霉属和横梗霉属等(图 8A), 琥珀酰辅酶 A-乙酰辅酶 A 转移酶和丙酰辅酶 A 转移酶由细菌少量产生(图 8B、8C), 乙酰辅酶 A 合成酶则由细菌(糖多孢菌属和葡萄球菌属等)和真菌(拟青霉属和根霉属等)共同产生(图 8D)。

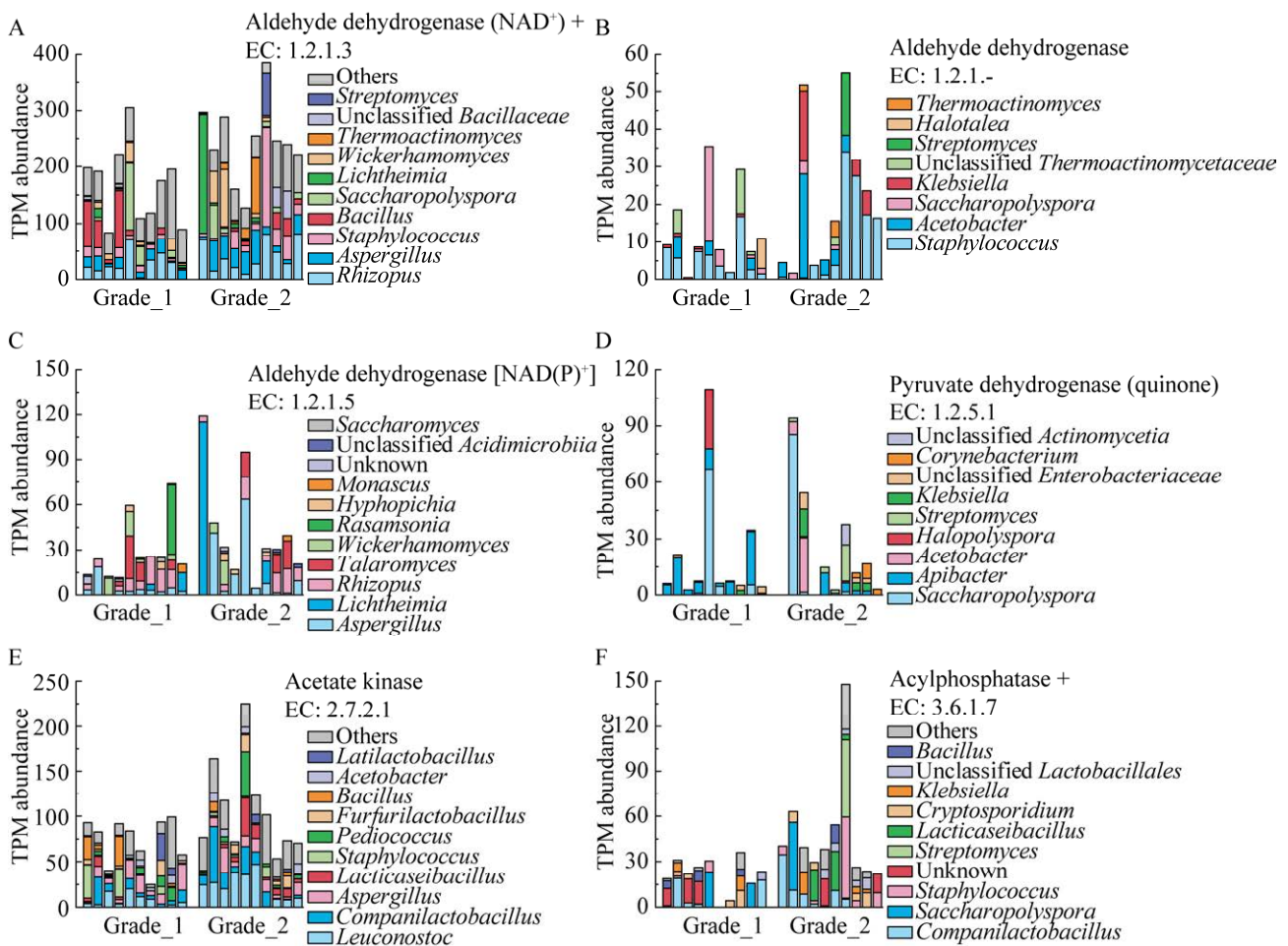


图 7 与乙醛、丙酮酸和乙酰磷酸生成乙酸相关酶的基因丰度及微生物来源

Figure 7 The TPM abundances and microbial sources of key enzymes related to the formation of acetate from acetaldehyde, pyruvate, and acetyl-phosphate. Aldehyde dehydrogenase (NAD^+) (EC: 1.2.1.3) (A), aldehyde dehydrogenase (EC: 1.2.1.-) (B), aldehyde dehydrogenase [NAD(P)^+] (EC: 1.2.1.5) (C), pyruvate dehydrogenase (quinone) (EC: 1.2.5.1) (D), acetate kinase (EC: 2.7.2.1) (E), and acylphosphatase (EC: 3.6.1.7) (F); The mark + represented the enzyme with significantly higher TPM abundance in Grade_2 (significance level: 0.05).

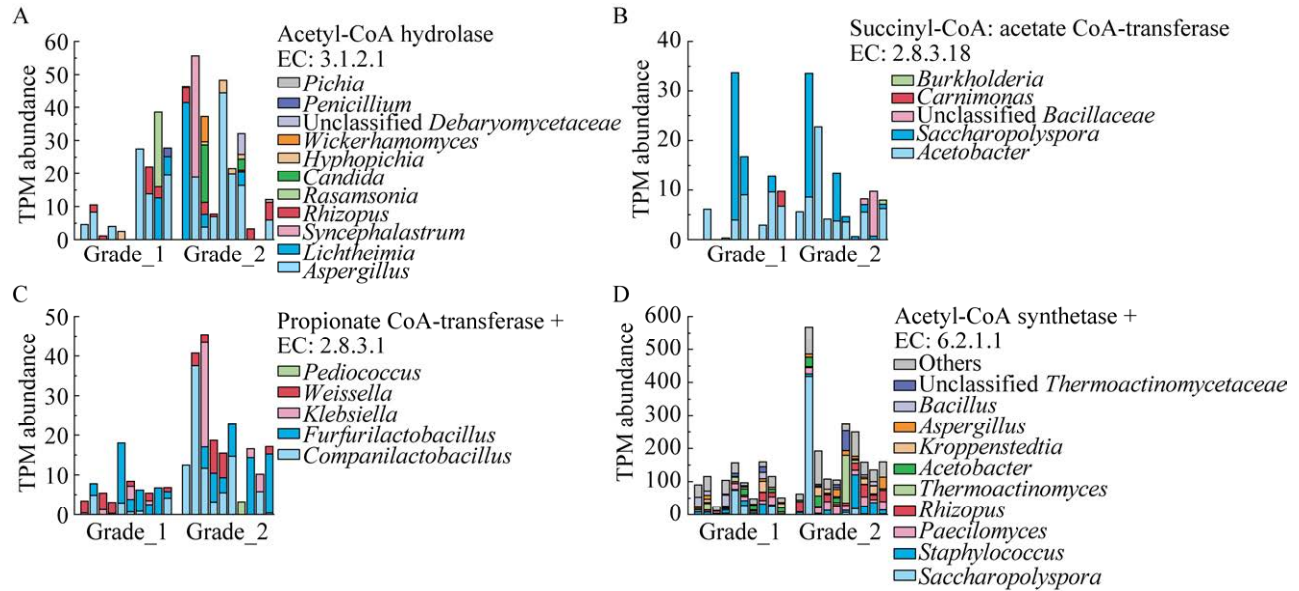


图 8 乙酰辅酶 A 和乙酸相互转化相关酶的基因丰度及微生物来源

Figure 8 The TPM abundances and microbial sources of key enzymes related to the conversion between acetyl-CoA and acetate. Acetyl-CoA hydrolase (EC: 3.1.2.1) (A), succinyl-CoA: acetate CoA-transferase (EC: 2.8.3.18) (B), propionate CoA-transferase (EC: 2.8.3.1) (C), and acetyl-CoA synthetase (EC: 6.2.1.1) (D). +: The enzyme with significantly higher TPM abundance in Grade_2 (significance level: 0.05).

虽然乙酸代谢涉及途径复杂, 酶类众多, 但在关注的 10 种酶中, 二级大曲中其基因丰度均高于一级大曲, 其中, 乙醛脱氢酶 NAD^+ 、酰基磷酸酶、丙酰辅酶 A 转移酶和乙酰辅酶 A 合成酶基因丰度显著高于一级大曲 ($P \leq 0.05$) (图 7、8)。与乳酸代谢类似, 成品大曲可能倾向于乙酸分解代谢, 二级大曲中更高基因丰度的乙酸代谢酶类促进了乙酸的分解。此外, 有报道显示乙酸含量很高会抑制其分解代谢, 因为酸性条件下, 乙酸代谢相关的 TCA 循环和乙醛酸循环关键基因的表达均下调, 主导乙酸形成和消耗的“乙酰辅酶 A-乙酰磷酸-乙酸”途径也被抑制^[28]。一级大曲中更高酸度可能会抑制乙酸分解代谢相关的酶类, 使其乙酸含量高于二级大曲, 并导致其酸度高于二级大曲。

3 结论

本研究基于宏基因组学比较了不同质量等

级中温大曲的微生物群落组成与潜在功能。结果表明, 2 种大曲的真菌微生物群落组成具有显著性差异。一级大曲含有更高相对丰度的丝状真菌, 主要分布于曲霉属、罗萨氏菌属、拟青霉属和篮状菌属等, 其与环境信息处理和细胞过程相关途径的基因相对丰度普遍显著高于二级大曲。一级大曲中薄层菌属和曲霉属等提供更高基因丰度的 α -淀粉酶, 使其液化力显著高于二级大曲。二级大曲则含有更高相对丰度的横梗霉属、根霉属和毕赤酵母属, 以及乳酸菌类微生物, 如伴生乳杆菌属、魏斯氏菌属和黏液乳杆菌属等, 其与代谢相关途径的基因相对丰度显著较高, 如碳水化合物代谢、能量代谢和核苷酸代谢等。二级大曲中较多的乳酸菌类群有利于提高乙醇脱氢酶基因丰度, 同时, 糖多孢菌属、葡萄球菌属、曲霉属和高温放线菌属等提供了更多的羧酸酯酶基因丰度, 分别使其具有较高的发酵力、酯化力。二级大曲中

较多的乳酸菌还可能产生更多的乳酸脱氢酶降解乳酸, 同时二级大曲中更高基因丰度的乙酸代谢相关酶类可促进其乙酸分解代谢, 使得二级大曲酸度显著低于一级大曲。综上所述, 本研究分析了大曲微生物群落组成, 及其在大曲酶活、乳酸和乙酸代谢中贡献程度, 从群落功能视角探讨了目前大曲质量评价体系的科学性, 为建立完善的大曲质量评价体系以及理性地调控群落功能奠定理论基础。

参考文献

- [1] 薄涛, 吕娜, 杨凯环, 张娇娇, 张锦华, 白宝清, 田翔, 范三红. 白酒大曲发酵过程中微生物群落及功能研究进展[J/OL]. 食品科学, [2023-06-26]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.2206.TS.20221229.1953.018.html>.
BO T, LÜ N, YANG KH, ZHANG JJ, ZHANG JH, BAI BQ, TIAN X, FAN SH. Overview and recent advances in the composition and function of microbial community in the fermentation of Baijiu Daqu[J/OL]. Food Science, [2023-06-26]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.2206.TS.20221229.1953.018.html> (in Chinese).
- [2] JIN GY, ZHU Y, XU Y. Mystery behind Chinese liquor fermentation[J]. Trends in Food Science & Technology, 2017, 63: 18-28.
- [3] KANG JM, XUE YS, CHEN XX, HAN BZ. Integrated multi-omics approaches to understand microbiome assembly in Jiuqu, a mixed-culture starter[J]. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 2022, 21(5): 4076-4107.
- [4] LI HD, LIU SY, LIU YB, HUI M, PAN CM. Functional microorganisms in Baijiu Daqu: research progress and fortification strategy for application[J]. Frontiers in Microbiology, 2023, 14: 1119675.
- [5] ZHENG XW, TABRIZI MR, NOUT MJR, HAN BZ. Daqu-A traditional Chinese liquor fermentation starter[J]. Journal of the Institute of Brewing, 2011, 117(1): 82-90.
- [6] 丁芳, 张原嶂, 蒋英丽, 陈波, 陈小雪, 韩北忠. 不同等级高温大曲微生物群落和代谢物的特征分析[J]. 中国酿造, 2022, 41(11): 24-30.
DING F, ZHANG YD, JIANG YL, CHEN B, CHEN XX, HAN BZ. Microbial communities and metabolites characteristics of high temperature Daqu with different grades[J]. China Brewing, 2022, 41(11): 24-30 (in Chinese).
- [7] FAN GS, FU ZL, TENG C, WU QH, LIU PX, YANG R, MINHAZUL KAHM, LI XT. Comprehensive analysis of different grades of roasted-sesame-like flavored Daqu[J]. International Journal of Food Properties, 2019, 22(1): 1205-1222.
- [8] ZHANG YD, DING F, SHEN Y, CHENG W, XUE YS, HAN BZ, CHEN XX. Characteristics of the microbiota and metabolic profile of high-temperature Daqu with different grades[J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2022, 38(8): 137.
- [9] 向港兴, 陈莹琪, 沈毅, 王西, 张亚东, 罗惠波, 黄丹. 不同等级浓香型大曲微生物群落结构与理化性质的比较分析[J]. 食品科学, 2022, 43(18): 184-191.
XIANG GX, CHEN YQ, SHEN Y, WANG X, ZHANG YD, LUO HB, HUANG D. Comparative analysis of microbial community structure and physicochemical properties of different grades of nongxiangxing Daqu[J]. Food Science, 2022, 43(18): 184-191 (in Chinese).
- [10] WANG YF, DONG QB, HU SX, ZOU H, WU TT, SHI J, ZHANG HF, SHENG YH, SUN W, KONG XQ, CHEN LM. Decoding microbial genomes to understand their functional roles in human complex diseases[J]. iMeta, 2022, 1(2): e14.
- [11] LIU WH, CHAI LJ, WANG HM, LU ZM, ZHANG XJ, XIAO C, WANG ST, SHEN CH, SHI JS, XU ZH. Bacteria and filamentous fungi running a relay race in Daqu fermentation enable macromolecular degradation and flavor substance formation[J]. International Journal of Food Microbiology, 2023, 390: 110118.
- [12] MENZEL P, LEE NG K, KROGH A. Fast and sensitive taxonomic classification for metagenomics with Kaiju[J]. Nature Communications, 2016, 7: 11257.
- [13] ZHU WH, LOMSADZE A, BORODOVSKY M. Ab initio gene identification in metagenomic sequences[J]. Nucleic Acids Research, 2010, 38(12): e132.
- [14] YANG Y, WANG ST, LU ZM, ZHANG XJ, CHAI LJ, SHEN CH, SHI JS, XU ZH. Metagenomics unveils microbial roles involved in metabolic network of flavor development in medium-temperature Daqu starter[J]. Food Research International, 2021, 140: 110037.
- [15] 沈才洪, 张良, 应鸿, 许德富, 沈才萍. 大曲质量标准体系设置的探讨[J]. 酿酒科技, 2005(11): 19-24.
SHEN CH, ZHANG L, YING H, XU DF, SHEN CP. Study on Daqu quality standards(V)—investigation on the setting of Daqu quality judgment standards

- system[J]. *Liquor-Making Science & Technology*, 2005(11): 19-24 (in Chinese).
- [16] XIAO C, LU ZM, ZHANG XJ, WANG ST, AO L, SHEN CH, SHI JS, XU ZH. Bio-heat is a key environmental driver shaping the microbial community of medium-temperature Daqu[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2017, 83(23): e01550-17.
- [17] HUANG YH, YI ZL, JIN YL, HUANG MJ, HE KZ, LIU DY, LUO HB, ZHAO D, HE H, FANG Y, ZHAO H. Metatranscriptomics reveals the functions and enzyme profiles of the microbial community in Chinese Nong-flavor liquor starter[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2017, 8: 1747.
- [18] WU Q, ZHU Y, FANG C, WIJFFELS RH, XU Y. Can we control microbiota in spontaneous food fermentation? Chinese liquor as a case example[J]. *Trends in Food Science & Technology*, 2021, 110: 321-331.
- [19] CAI WC, WANG YR, NI H, LIU ZJ, LIU JM, ZHONG JA, HOU QC, SHAN CH, YANG XQ, GUO Z. Diversity of microbiota, microbial functions, and flavor in different types of low-temperature Daqu[J]. *Food Research International*, 2021, 150: 110734.
- [20] 熊君燕, 李小东, 谢圣凯, 余培斌, 陈建新. 清香型白酒中乳酸菌和酵母菌的相互作用[J]. *微生物学通报*, 2017, 44(8): 1767-1776.
- XIONG JY, LI XD, XIE SK, YU PB, CHEN JX. Interaction between lactic acid bacteria and yeasts in light-aroma liquor[J]. *Microbiology China*, 2017, 44(8): 1767-1776 (in Chinese).
- [21] 张霞, 郑佳, 赵东, 乔宗伟, 安明哲, 杨康卓, 罗青春. 多粮浓香型白酒中特征酵母菌与耐酸乳杆菌的关系[J]. *微生物学通报*, 2019, 46(7): 1571-1581.
- ZHANG X, ZHENG J, ZHAO D, QIAO ZW, AN MZ, YANG KZ, LUO QC. Relationship between typical yeasts and *Lactobacillus acetotolerans* in multi-grain strong aroma Baijiu[J]. *Microbiology China*, 2019, 46(7): 1571-1581 (in Chinese).
- [22] ZOU W, ZHAO CQ, LUO HB. Diversity and function of microbial community in Chinese strong-flavor Baijiu ecosystem: a review[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2018, 9: 671.
- [23] 刘国英, 穆文彬, 李家运, 胡帮超, 郭增, 方颂平. 大曲培养过程中生酸规律的研究[J]. *酿酒科技*, 2004(5): 49-50.
- LIU GY, MU WB, LI JY, HU BC, GUO Z, FANG SP. Study on acid-producing rules in Daqu culture[J]. *Liquor-Making Science & Technology*, 2004(5): 49-50 (in Chinese).
- [24] UBIPARIP Z, BEERENS K, FRANCEUS J, VERCAUTEREN R, DESMET T. Thermostable alpha-glucan phosphorylases: characteristics and industrial applications[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2018, 102(19): 8187-8202.
- [25] JOSHI N, ANDHARE P, MARCHAWALA F, BHATTACHARYA I, UPADHYAY D. A study on amylase: review[J]. *International Journal of Biology, Pharmacy and Allied Sciences*, 2021, 10(4): 333-340.
- [26] XU Y, WANG D, FAN WL, MU XQ, CHEN J. Traditional Chinese biotechnology[M]//*Biotechnology in China II*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2009: 189-233.
- [27] LI WW, FAN GS, FU ZL, WANG WH, XU YQ, TENG C, ZHANG CN, YANG R, SUN BG, LI XT. Effects of fortification of Daqu with various yeasts on microbial community structure and flavor metabolism[J]. *Food Research International*, 2020, 129: 108837.
- [28] ORR JS, CHRISTENSEN DG, WOLFE AJ, RAO CV. Extracellular acidic pH inhibits acetate consumption by decreasing gene transcription of the tricarboxylic acid cycle and the glyoxylate shunt[J]. *Journal of Bacteriology*, 2018, 201(2): e00410-e00418.