基于高通量测序和纯培养联用技术的药曲微生物多样性解析

黄怡[1,2],蔡文超[3],余培荣[4],陈炜[4],单春会[3],郭壮[1,2],王玉荣[1,2]

1. 湖北文理学院 酿酒技术产业学院,湖北 襄阳 441053;
2. 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;
3. 石河子大学 食品学院,新疆 石河子 832003;
4. 新疆五五酒业有限公司,新疆 胡杨河 830099

摘要: 采用 MiSeq 高通量测序和纯培养联用技术对采集自江西省南昌市的药曲样品进行微生物多样性解析,以揭示药曲中的微生物群落结构。结果表明:药曲中细菌类群的丰富度和多样性均明显高于真菌类群,细菌主要优势属为片球菌属(*Pediococcus*)和促生乳杆菌属(*Levilactobacillus*),平均相对含量分别为 38.04%和 13.00%,真菌优势属为假丝酵母属(*Candida*)和复膜孢酵母属(*Saccharomycopsis*),平均相对含量分别为 78.30%和 17.92%。从药曲中分离出的 9 株细菌被鉴定为戊糖片球菌(*Pediococcus pentosaceus*)、乳酸片球菌(*Pediococcus acidilactici*)和地衣芽孢杆菌(*Bacillus licheniformis*)3 个种,7 株真菌被鉴定为扣囊复膜酵母(*Saccharomycopsis fibuligera*)、马兰加酵母(*Saccharomycopsis malanga*)、库德里阿兹威毕赤酵母(*Pichia kudriavzevii*)和酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)4 个种。

关键词: 药曲;MiSeq 高通量测序;纯培养;微生物多样性
中图分类号: TS201.3 **文献标识码:** A

0 引言

药曲作为小曲的一种,是以大米粉和中草药为原料制作而成,常用于米酒、黄酒和小曲白酒的酿造[1]。在药曲制作过程中添加中药材,既可促进药曲中微生物多样性和丰富度的提升[2],又可通过提高酯类物质含量及降低杂醇油含量,实现酒体品质的提升[3]。在酒体酿造过程中,酒曲微生物会参与原料降解与转化、风味物质代谢、有害物质降解等过程,对提高出酒率和优级率具有重要作用[4]。因此,全面解析药曲中微生物的多样性,对揭示功能微生物类群及其与酒体品质的关联性具有重要意义。然而,目前关于药曲微生物多样性的解析研究仍较少。

收稿日期:2024-10-14;**修回日期:**2025-01-13
基金项目:新疆生产建设兵团第七师胡杨河市“揭榜挂帅”项目(QS2024011);湖北省高等学校优秀中青年科技创新团队计划项目(T2023022)
作者简介:黄怡(2000—),女,湖北省襄阳市人,湖北文理学院硕士研究生,主要研究方向为食品生物技术。E-mail:huangyi200003@163.com
通信作者:王玉荣(1993—),女,湖北省襄阳市人,湖北文理学院副教授,博士,主要研究方向为食品生物技术。E-mail:wang_HFu6456@163.com

MiSeq 高通量测序技术作为第二代测序技术，具有灵敏度高、通量高、操作简单等优点，在短时间内可获取大量有关微生物多样性和群落结构的数据，目前已广泛应用于酒曲微生物多样性研究领域[5]。例如，X. X. Zhao 等[6]基于 MiSeq 高通量测序技术分析了湖北省孝感地区和四川省大竹地区米酒曲的细菌群落结构，发现米酒曲菌群主要由魏斯氏菌(*Weissella*)、乳酸菌属(*Lactobacillus*)、乳球菌属(*Lactococcus*)、芽孢杆菌属(*Bacillus*)等组成。在全面解析酒曲功能微生物类群的基础上，筛选核心功能菌种并人工合成酿造菌群，对实现白酒酿造过程精准控制和品质稳定提升具有重要意义[7]，而采用纯培养技术获得微生物菌株是开展相关研究的先决条件。例如，C. X. Wang 等[8]在采用 MiSeq 高通量测序技术对贵州小曲真菌多样性进行解析的基础上，进一步采用纯培养技术分离保藏了葡萄牙棒孢酵母(*Clavispora lusitaniae*)等多种酵母菌资源。因此，采用 MiSeq 高通量测序和纯培养联用技术解析药曲微生物多样性具有较强的可行性。

基于此，本研究拟以采集自江西省南昌市的 3 份药曲为研究对象，采用 MiSeq 高通量测序技术解析其微生物多样性，并采用纯培养技术对药曲中可培养微生物进行分离鉴定，以期对药曲微生物进行全面的解析，为酿酒微生物种质资源的挖掘和利用提供参考。

1 材料与方法

1.1 主要材料与试剂

药曲样品：采集自江西省南昌市，于酒曲贮存室随机抽取同一批次生产的 3 份样品，分别命名为 JXYQ1、JXYQ2 和 JXYQ3。药曲均以大米粉为原料，添加辣蓼草(*Polygonum hydropiper* L.)、陈皮(*Citri Reticulatae Pericarpium*)、桑叶(*Mori Folium*)等中草药粉及陈曲粉制成。先将大米加水浸泡后粉碎过筛，再与中草药粉和陈曲粉按照一定比例拌料均匀，用竹筛筛成直径约 2 cm 的圆球形酒坯，入房培曲发酵 48 h。

主要试剂：QIAGEN DNeasy mericon Food Kit 试剂盒，德国 QIAGEN 公司；5×TransStartTM FastPfu Buffer、脱氧核糖核苷三磷酸(deoxy-ribonucleoside triphosphate，dNTPs)、FastPfu Fly DNA Polymerase、牛血清白蛋白(bovine albumin，BSA)、pMD18-T Vector、2×Taq PCR Master Mix，北京全式金生物技术有限公司；正/反向引物 338F/806R、ITS1F/ITS4R、27F/1495R、M13R(-48)/M13F(-47)，天一辉远(武汉)生物科技有限公司；营养琼脂培养基(NA 培养基)、德氏乳杆菌培养基(MRS 培养基)、马铃薯葡萄糖琼脂培养基(PDA 培养基)，北京奥博星生物技术有限责任公司。

1.2 主要仪器与设备

DL-CJ-1200 型洁净工作台，北京东联哈尔仪器制造有限公司；LBI-250 型生化培养箱，上海龙跃仪器设备有限公司；ECLIPSE Ci 型生物显微镜，日本 Nikon 公司；Veriti FAST 型梯度 PCR 仪，美国 ABI 公司；Bio-rad 基础电泳仪，北京赛百奥科技有限公司；MiSeq PE300 型高通量测序平台，美国 Illumina 公司；R930 型机架式服务器，美国 Dell 公司。

1.3 实验方法

1.3.1 宏基因组 DNA 提取、PCR 扩增和 MiSeq 高通量测序 使用 QIAGEN DNeasy mericon Food Kit 试剂盒提取药曲中微生物宏基因组 DNA 后，参照 Q. C. Hou 等[9]的扩增体系和扩增程序，以宏基因组 DNA 为模板，对细菌 16S rRNA V_3—V_4 区序列和真菌 ITS 序列进行 PCR 扩增。使用 1.0%琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 扩增产物，将合格 PCR 产物送至上海美吉生物医药科技有限公司进行 MiSeq 高通量测序。

1.3.2 生物信息学分析方法 下机序列进行拼接和质控后，基于 QIIME(v 1.9.0)分析平台，使用 PyNAST 工具校准并对齐序列[10]，采用 UCLUST 算法划分序列并建立操作分类单元(Operational Taxonomic Units，OTU)[11]，并通过 UCHIME 算法去除含嵌合体序列的 OTU[12]，分别选取细菌或真菌的 OTU 代表性序列与核糖体数据库项目(Ribosomal Database Project，RDP)[13]或 UNITE 数据库[14]进行同源比对，以确定其细菌或真菌类群的分类学地位。

1.3.3 可培养微生物分离纯化 称取 10 g 药曲样品于 90 mL 无菌生理盐水中，摇床振荡 30 min 混

匀,制得菌悬液;取 1 mL 菌悬液于无菌生理盐水中,以 10 倍为稀释梯度,逐次稀释到 10^{-7},并分别从稀释倍数为 10^{-5}~10^{-7} 的菌悬液中取 100 μL 涂布于各培养基平皿上,每个稀释液各做 3 个平行,NA 培养基于 37 ℃倒置培养 1 d,MRS 培养基于 30 ℃倒置培养 3 d,PDA 培养基于 28 ℃正置培养 5 d。挑取具有典型形态特征的单菌落进行 3 次划线纯化,经革兰氏染色后观察菌株形态,采用甘油保藏法将菌株保藏于-80 ℃超低温冰箱中,备用。

1.3.4 可培养微生物分子生物学鉴定 将纯化后的菌株接种于液体培养基中,过夜培养后收集菌体,按照 A. Mve-Obing 等[15]的方法进行菌株总 DNA 提取。以总 DNA 为模板进行 PCR 扩增、清洁、连接和鉴定,其中细菌使用 16S rDNA 基因通用引物 27F/1495R,真菌使用 ITS 序列通用引物 ITS1F/ITS4R,阳性克隆子送至上海桑尼生物科技有限公司进行测序后,构建系统发育树进行系统发育分析。

1.4 数据处理

采用 R 4.3.3 软件绘制优势门、属的气泡图,利用 DNAMAN 6.0 和 Mega 7.0 软件绘制系统发育树。

2 结果与分析

2.1 药曲细菌和真菌类群的 α 多样性分析

通过 MiSeq 高通量测序技术,共获得 205 726 条 16S rRNA 序列和 246 453 条 ITS 序列,按照 UCLUST 算法划分为 758 个细菌 OTU 和 128 个真菌 OTU,经 RDP 数据库比对后将所有细菌序列划分为 21 个细菌门和 247 个细菌属,经 UNITE 数据库比对后将所有真菌序列划分为 5 个真菌门和 37 个真菌属。药曲测序结果及分类见表 1。由表 1 可知,药曲细菌类群的 Chao1 指数和 Shannon 指数均明显高于真菌类群。微生物 α 多样性指在特定生态环境或生态系统内单个群落本身的多样性情况,是反映微生物群落丰富度和多样性的综合指标[16]。其中 Chao1 指数反映样本中 OTU 数目的高低,指数越高,表明样本中物种丰富度越高;Shannon 指数是用来描述 OTU 出现的紊乱和不确定性,指数越大,表明群落多样性越高。因此,药曲细菌类群的丰富度和多样性均明显高于真菌类群。

2.2 药曲细菌和真菌类群的门、属水平分析

本研究将平均相对含量>1.00%的门或属定义为优势门或优势属,药曲中细菌优势门和优势属的平均相对含量如图 1 所示。由图 1 可知,药曲细菌优势门分别为厚壁菌门(Firmicutes,79.01%)、变形杆菌门(Proteobacteria,17.20%)、拟杆菌门(Bacteroidetes,1.83%)和放线菌门(Actinobacteria,1.32%);细菌优势属分别为片球菌属(*Pediococcus*,38.04%)、促生乳杆菌属(*Levilactobacillus*,13.00%)、芽孢杆菌属(*Bacillus*,7.29%)、黄单胞菌属(*Xanthomonas*,4.47%)、泛菌属(*Pantoea*,2.67%)、鞘氨醇单胞菌(*Sphingomonas*,2.05%)、嗜碱盐芽孢杆菌属(*Alkalihalobacillus*,1.82%)、联合乳杆菌属(*Ligilactobacillus*,1.77%)、假单胞菌属(*Pseudomonas*,1.71%)、寡养单胞菌属(*Stenotrophomonas*,1.67%)、不动杆菌属(*Acinetobacter*,1.63%)、醋杆菌属(*Acetobacter*,1.52%)、类芽孢杆菌属(*Paenibacillus*,1.22%)和农杆菌属(*Agrobacterium*,1.17%)。唐佳代等[17]采用 MiSeq 高通量测序技术,发现贵州地区酿酒小曲中细菌优势属为芽孢杆菌属、肠杆菌属

表 1 药曲测序结果及分类

Table 1 Sequencing results and classification of medicinal starter cultures

样品编号	类群	序列数/条	OTU 数/个	门/个	纲/个	目/个	科/个	属/个	Chao1 指数	Shannon 指数
JXYQ1	细菌	81 670	395	15	25	43	81	153	400	4.82
JXYQ2		77 225	377	10	28	45	86	147	384	4.55
JXYQ3		46 831	409	16	22	50	85	156	420	3.91
JXYQ1	真菌	74 265	80	6	10	10	21	26	88	0.89
JXYQ2		79 552	107	5	12	14	28	33	112	1.61
JXYQ3		92 636	67	4	8	8	15	18	75	0.88

注:Chao1 指数和 Shannon 指数均在测序量为 45 010 条序列时计算所得。

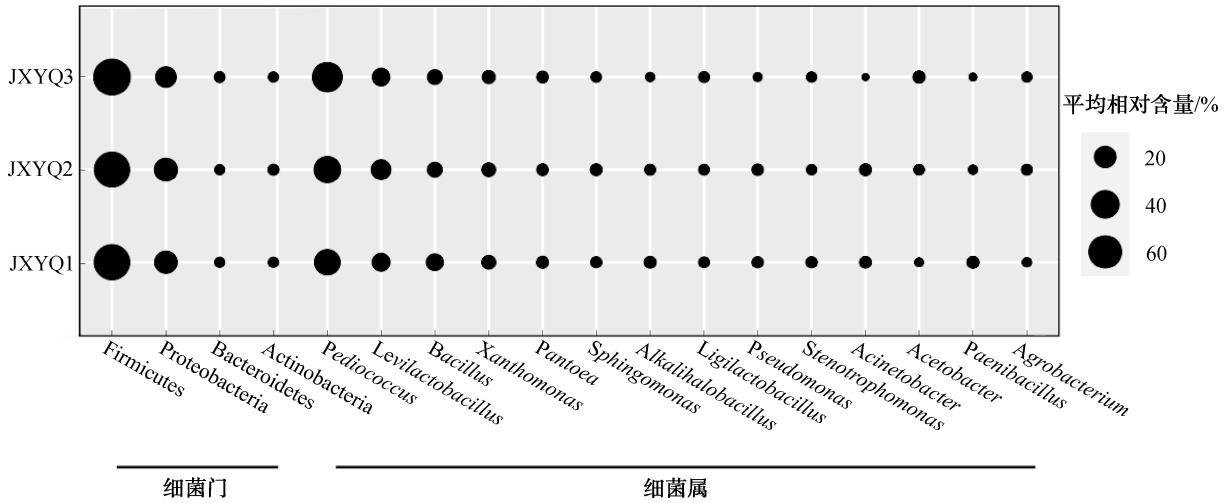

图 1 药曲中细菌优势门和优势属的平均相对含量

Fig. 1 The average relative abundance of dominant bacterium phylum and genus in medicine koji

(*Enterobacter*)、乳酸杆菌属(*Lactobacillus*)、不动杆菌属和片球菌属,本研究结果与其较一致。芽孢杆菌属作为功能性细菌,能够分泌淀粉酶、蛋白酶等水解酶,可将淀粉、蛋白质等大分子物质转化为葡萄糖和氨基酸,进而产生各种风味前体物质,有助于酒体风味的形成[18]。片球菌属是一类能产生白酒风味物质的活性功能细菌,能够减少二乙酰、胞外多糖、生物胺等物质的含量,改善酒体的香气品质[19]。此外,本研究发现药曲中还含有大量促生乳杆菌属,隶属于该菌属的细菌具有较好的耐酸性,且能够产生甘露醇、胞外多糖等功能性成分,有助于酒体风味和品质的提升[20]。

药曲中真菌优势门和优势属的平均相对含量如图 2 所示。由图 2 可知,药曲的真菌优势门为子囊菌门(Ascomycota,98.59%),真菌优势属为假丝酵母属(*Candida*,78.30%)和复膜孢酵母属(*Saccharomycopsis*,17.92%)。向凡舒等[21]采用 MiSeq 高通量测序技术,发现湖北省恩施土家族苗族自治州建始县米酒曲中真菌优势属为淀粉霉属(*Amylomyces*)、复膜孢酵母属和威克汉姆酵母属(*Wickerhamomyces*),而本研究结果与其差异较大,这可能是由制作酒曲的原料、工艺、当地气候等因素不同所致。假丝酵母属作为主要的产酯酵母,能将糖、醛、有机酸等物质转化成酯、醇、醛等芳香物质,对白酒风味

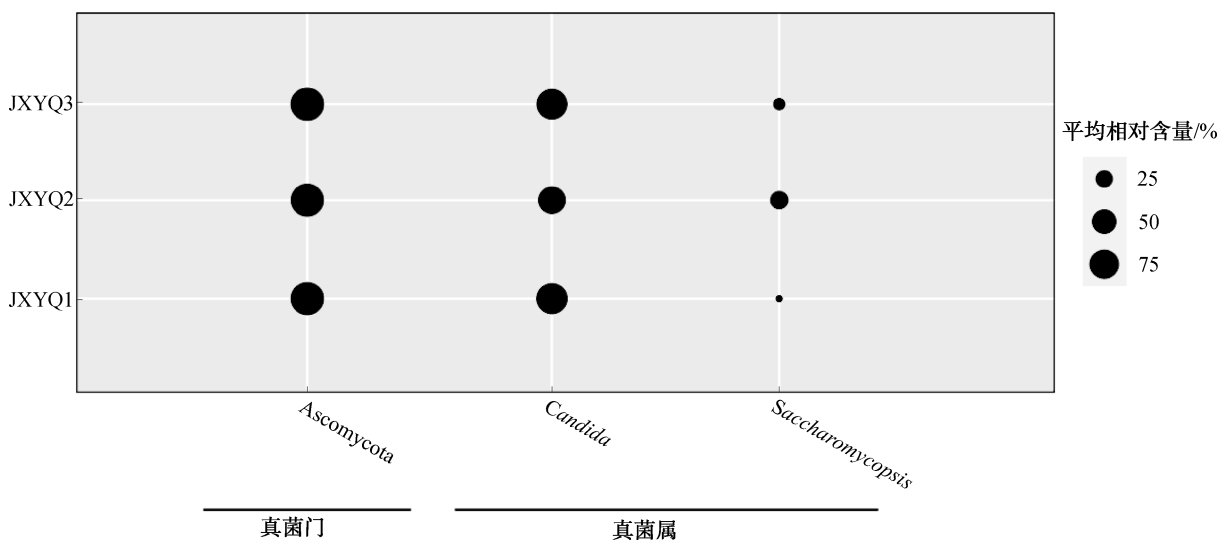

图 2 药曲中真菌优势门和优势属的平均相对含量分析

Fig. 2 The average relative abundance of dominant fungus phylum and genus in medicine koji

的形成和感官品质的提升具有积极作用[22]。复膜孢酵母属作为产酶及产酯酵母,能够分泌淀粉酶、酸性蛋白酶、β-葡萄糖苷酶等多种水解酶,可降解大分子底物,并进一步发酵产生棕榈酸乙酯、乙酸乙酯等酯类物质,有助于改善酒体香气及丰富口感[23]。

2.3 药曲中可培养微生物分离鉴定结果分析

2.3.1 可培养细菌分离鉴定结果分析 根据菌落大小、颜色、形态等特征的不同,本研究从3份药曲样品中共分离出9株疑似细菌的菌株,部分细菌分离株的菌落形态和菌体形态如图3所示,基于16S rRNA序列构建的细菌分离株系统发育树如图4所示。由图3可知,菌株HBUAS73349、HBUAS73352、HBUAS73354和HBUAS73355均可在MRS培养基上生长,菌落为圆形,较小,呈白色或乳白色,为革兰氏染色阳性菌;菌体为球状,排列成对。菌株HBUAS73357可在NA培养基上生长,菌落近圆形,较小,呈淡黄色,为革兰氏染色阳性菌;菌体为直杆或短杆状,单个排列。由图4可知,分离出的9株细菌被鉴定为3个种,其中菌株HBUAS73350、HBUAS73351、HBUAS73352、HBUAS73354和HBUAS73356被鉴定为戊糖片球菌(*Pediococcus pentosaceus*),菌株

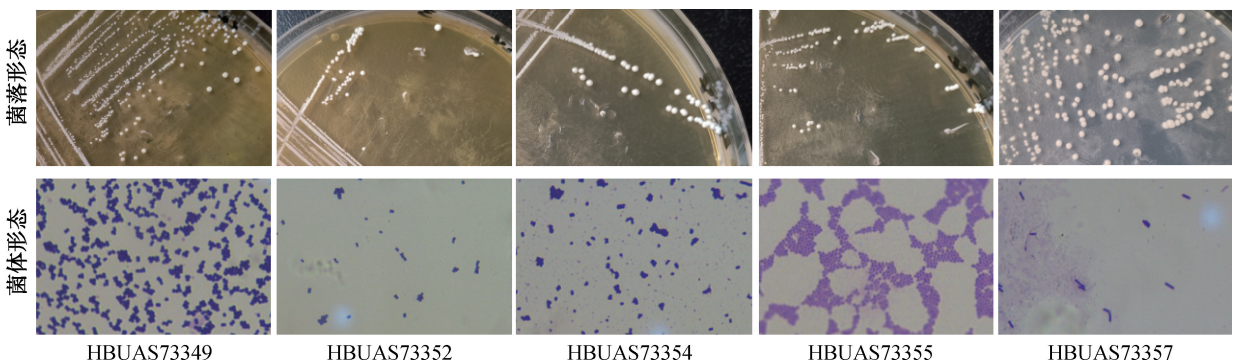

图3 部分细菌分离株的菌落形态和菌体形态

Fig. 3 Colony morphology and mycelial morphology of some bacteria strains

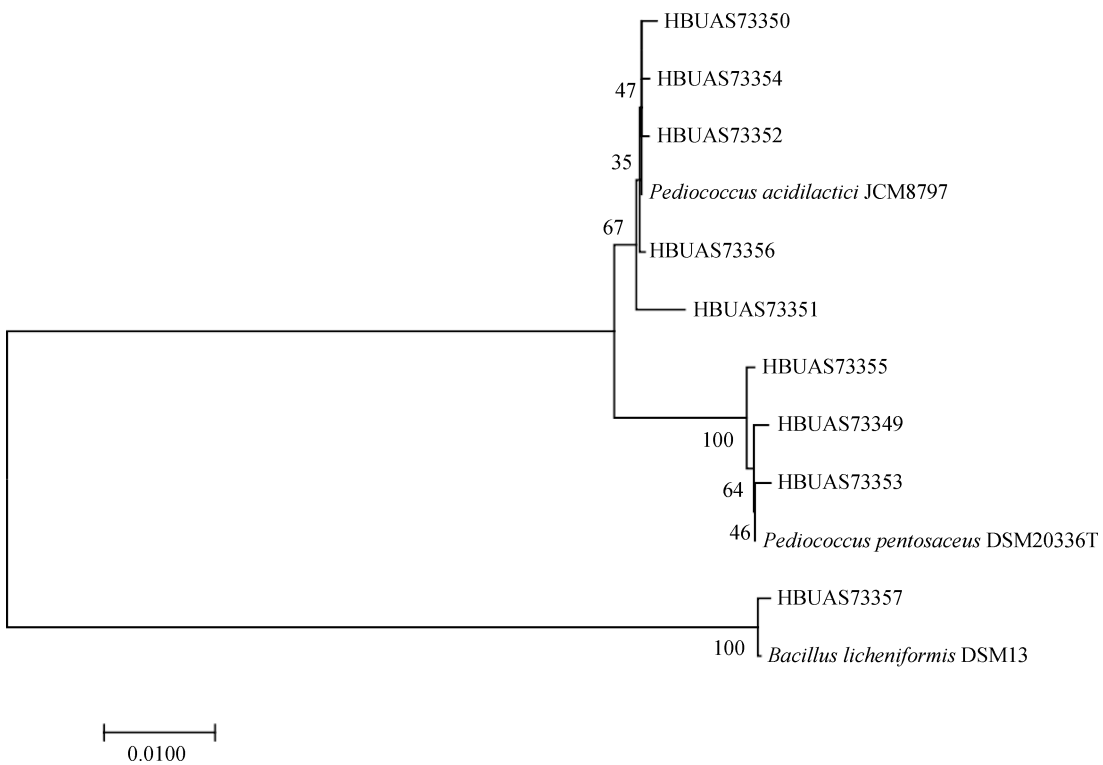

图4 基于16S rRNA序列构建的细菌分离株系统发育树

Fig. 4 Phylogenetic tree of bacteria isolates constructed based on 16S rRNA gene sequence

HBUAS73349、HBUAS73353 和 HBUAS73355 被鉴定为乳酸片球菌(*Pediococcus acidilactici*),菌株 HBUAS73357 被鉴定为地衣芽孢杆菌(*Bacillus licheniformis*)。因此,药曲中可培养的细菌优势类群以戊糖片球菌和乳酸片球菌这 2 种乳酸菌,以及地衣芽孢杆菌为主。有研究[24]指出,辣蓼草具有调控酒曲微生物群落结构及生物量的功能,且随着辣蓼草添加量的增加,戊糖片球菌的生物量也相应增多,这可能是导致戊糖片球菌成为药曲中优势菌种的原因之一。此外,戊糖片球菌能够以淀粉质原料为底物,发酵产生乳酸等酸性物质,具有改善发酵食品风味和口感的作用,目前已应用于馒头发酵剂的制备中[25]。

2.3.2 可培养真菌分离鉴定结果分析 根据菌落大小、颜色、形态等特征的不同,本研究从 3 份药曲样品中共分离出 7 株疑似真菌的菌株,部分真菌分离株的菌落形态和菌体形态如图 5 所示,基于 ITS 序列构建的真菌分离株系统发育树如图 6 所示。由图 5 可知,菌株 HBUAS72398 和 HBUAS72399 的菌落为圆形,较大,呈白色或淡黄色;菌体以丝状形式生长,只有少量出芽酵母细胞。菌株 HBUAS2400 和 HBUAS72401 的菌落为圆形,较小,呈白色或乳白色;菌体形态为椭圆形。由图 6 可知,分离出的 7 株真菌被鉴定为 4 个种,其中菌株 HBUAS72396 和 HBUAS72399 被鉴定为扣囊复膜酵母(*Saccharomycopsis fibuligera*),菌株 HBUAS72397 和 HBUAS72398 被鉴定为马兰加酵母(*Saccharomycopsis malanga*),菌株 HBUAS72401 和 HBUAS72402 被鉴定为库德里阿兹威毕赤酵母(*Pichia kudriavzevii*),菌株 HBUAS72400 被鉴定为酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)。因此,药曲中可培养的真菌类群多样性较高,以扣囊复膜酵母、马兰加酵母、库德里阿兹威毕赤酵母、酿酒酵母等酵母菌为主。扣囊复膜酵母具有良好的产淀粉酶、糖化酶和 β-葡糖苷酶的能力,能够促进发酵底物的分解,提高酒体中乙醇的含量[26]。本研究团队曾从米酒曲中分离、鉴定和筛选出 1 株扣囊复膜酵母,使用该菌株酿造的红枣酒,不仅风味品质优良,且酒精度较高[27]。

3 结论

本研究采用 MiSeq 高通量测序和纯培养联用技术对采集自江西省南昌市的药曲样品进行微生物多样性解析,得到如下结论:药曲中细菌优势属为片球菌属和促生乳杆菌属,累计平均相对含量占比超过 50%,而真菌优势属为假丝酵母属和复膜孢酵母属,累计平均相对含量占比超过 90%。药曲中可培养细菌主要为戊糖片球菌、乳酸片球菌和地衣芽孢杆菌,可培养真菌为扣囊复膜酵母、马兰加酵母、库德里阿兹威毕赤酵母和酿酒酵母。本研究在一定程度上丰富了研究人员对江西省南昌市地区药曲微生物菌群的认识,为酿酒微生物种质资源的挖掘提供了菌株支持,但对其他地区药曲样品的微生物多样性并未进行深入了解。因此,未来可进一步扩大采样区域和样品数量,对不同地区药曲微生物多样性进行研究,以期深入解析不同地区药曲微生物多样性的差异和共性。

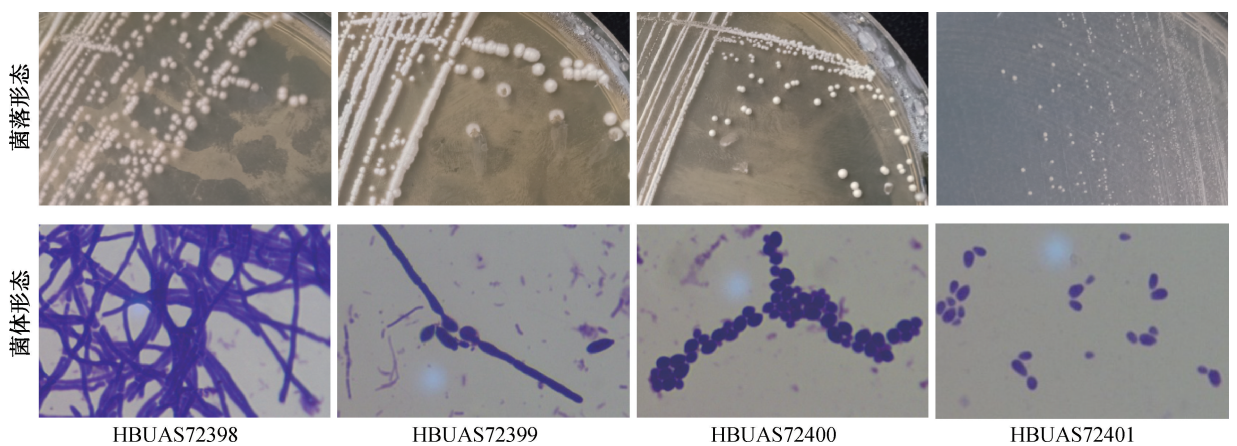

图 5 部分真菌分离株的菌落形态和菌体形态

Fig. 5 Colony morphology and mycelial morphology of some fungus strains

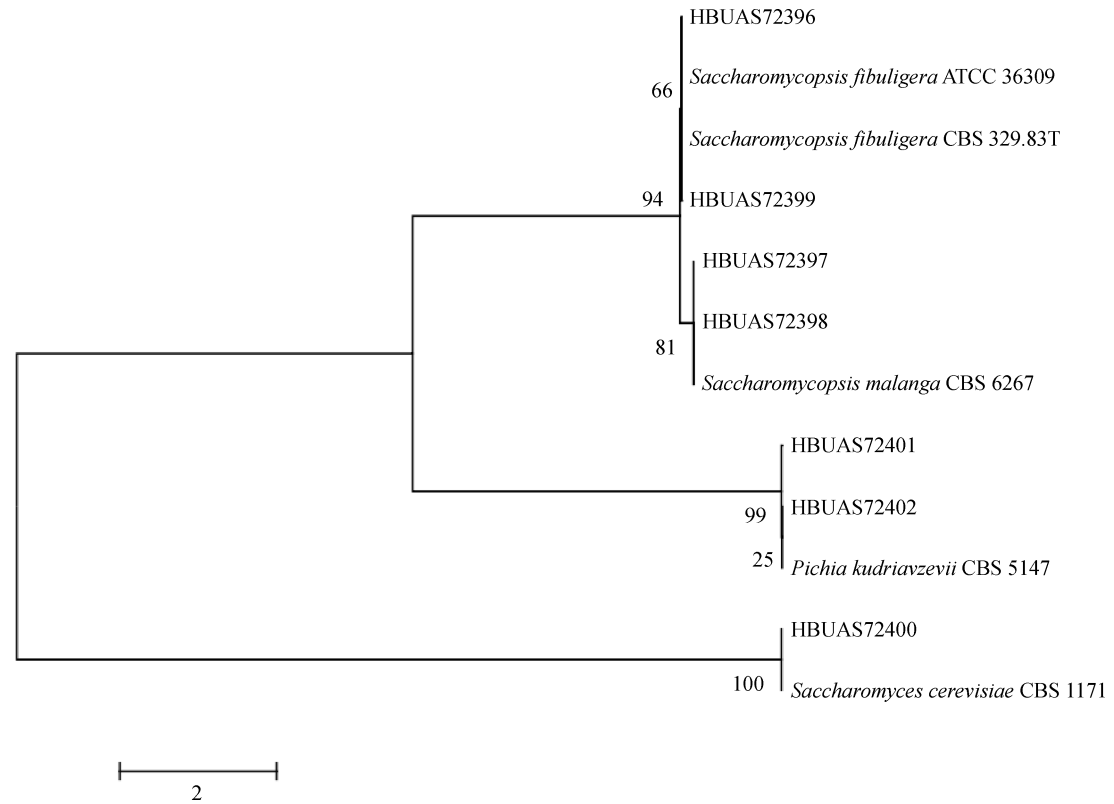

图 6 基于 ITS 序列构建的真菌分离株系统发育树

Fig. 6 Phylogenetic tree of fungus isolates constructed based on ITS gene sequence

参考文献:

[1] HOR P K,GOSWAMI D,GHOSH K,et al. Preparation of rice fermented food using root of *Asparagus racemosus* as herbal starter and assessment of its nutrient profile[J]. Systems Microbiology and Biomanufacturing,2022,2(1):147-156.

[2] 吴志,陈晓芸. 甜酒曲主要微生物的分离、筛选及其中草药制曲工艺研究[J]. 轻工科技,2020,36(5):18-20.

[3] 江威,李强,唐洁,等. 中药材对清香型白酒主要酿造微生物及风味物质的影响[J]. 中国酿造,2023,42(2):89-94.

[4] 梁敏华,赵文红,白卫东,等. 白酒酒曲微生物菌群对其风味形成影响研究进展[J]. 中国酿造,2023,42(5):22-27.

[5] QUIJADA N M, HERNÁNDEZ M, RODRÍGUEZ-LAZÁRO D. High-throughput sequencing and food microbiology[J]. Advances in Food and Nutrition Research, 2020,91:275-300.

[6] ZHAO X X,WANG Y R,CAI W C,et al. High-throughput sequencing-based analysis of microbial diversity in rice wine koji from different areas[J]. Current Microbiology,2020,77(5):882-889.

[7] 张清玫,刘芳,张建敏,等. 基于人工合成菌群提升白酒品质的策略分析[J]. 酿酒科技,2024,8:71-77.

[8] WANG C X, TANG J D, QIU S Y. Profiling of fungal diversity and fermentative yeasts in traditional Chinese Xiaoqu[J]. Frontiers in Microbiology,2020,11:2103.

[9] HOU Q C, WANG Y R, NI H, et al. Deep sequencing reveals changes in prokaryotic taxonomy and functional diversity of pit muds in different distilleries of China[J]. Annals of Microbiology,2022,72(1):12.

[10] NOURRISSON C,SCANZI J,BRUNET J,et al. Prokaryotic and eukaryotic fecal microbiota in irritable bowel syndrome patients and healthy individuals colonized with *Blastocystis*[J]. Frontiers in Microbiology,2021,12:713347.

[11] LI Y L,LIU S P,ZHANG S Y,et al. Spatiotemporal distribution of environmental microbiota in spontaneous fermentation workshop: The case of Chinese Baijiu[J]. Food Research International,2022,156:111126.

[12] XIAO R,CHEN S Q,WANG X Q,et al. Microbial community starters affect the profiles of volatile compounds in traditional Chinese Xiaoqu rice wine: Assement via high-throughput sequencing and gas chromatography-ion mobility spectrometry[J]. LWT-Food Science and Technology, 2022,170:114000.

[13] CAI W C,WANG Y R,HOU Q C,et al. PacBio sequencing combined with metagenomic shotgun sequencing provides insight into the microbial diversity of Zha-chili[J]. Food Bioscience,2021,40:100884.

[14] CHEN T Y,WANG H Y,SU W,et al. Analysis of the formation mechanism of volatile and non-volatile flavor sub-

stances in corn wine fermentation based on high-throughput sequencing and metabolomics [J]. Food Research International, 2023, 165: 112350.

[15] MVE-OBIANG A, MESTDAGH M, PORTAELS F. DNA isolation from chloroform/methanol-treated mycobacterial cells without lysozyme and proteinase K [J]. BioTechniques, 2001, 30(2): 272-274, 276.

[16] WANG X H, WANG S H, ZHAO H. Unraveling microbial community diversity and succession of Chinese Sichuan sausages during spontaneous fermentation by high-throughput sequencing [J]. Journal of Food Science and Technology, 2019, 56(7): 3254-3263.

[17] 唐佳代, 邱树毅, 王春晓, 等. 贵州地区酿酒小曲细菌多样性比较分析[J]. 中国酿造, 2019, 38(10): 55-59.

[18] ZHAO X X, LIU Y H, SHU L, et al. Study on metabolites of *Bacillus* producing soy sauce-like aroma in Jiang-flavor Chinese spirits [J]. Food Science & Nutrition, 2019, 8(1): 97-103.

[19] WADE M E, STRICKLAND M T, OSBORNE J P, et al. Role of *Pediococcus* in winemaking [J]. Australian Journal of Grape and Wine Research, 2019, 25(1): 7-24.

[20] ZHANG X R, LI Y X, ZHAO Y R, et al. Effect of *Levilactobacillus brevis* as a starter on the flavor quality of radish Paocai [J]. Food Research International, 2023, 168: 112780.

[21] 向凡舒, 朱媛媛, 邓凤, 等. 建始地区米酒曲细菌和真菌多样性研究[J]. 食品工业科技, 2021, 42(1): 126-131.

[22] 梁敏华, 赵文红, 白卫东, 等. 白酒酒曲微生物菌群对其风味形成影响研究进展[J]. 中国酿造, 2023, 42(5): 22-27.

[23] XU P, WU Y J, CHEN H, et al. Promoting microbial community succession and improving the content of esters and aromatic compounds in strong-flavor Daqu via bioaugmentation inoculation [J]. Food Bioscience, 2023, 56: 103299.

[24] 谢铃, 刘双平, 刘甜甜, 等. 辣蓼草对酒药关键微生物与品质的影响研究[J]. 食品与发酵工业, 2024, 50(23): 53-61.

[25] 赵晨辉. 馒头用酿酒酵母与乳酸菌的筛选及复合发酵剂的制备[D]. 阿拉尔: 塔里木大学, 2024.

[26] 王乃军, 马美荣. 扣囊复膜酵母在白酒生产中的应用研究进展[J]. 酿酒科技, 2023, 3: 115-119.

[27] 雷炎, 刘梦琦, 易秦振, 等. 扣囊复膜酵母在红枣酒中的应用[J]. 食品研究与开发, 2021, 42(5): 131-136.

Analysis of microbial diversity in meidicinal koji based on high-throughput sequencing and pure culture techniques

HUANG Yi[1,2], CAI Wenchao[3], YU Peirong[4], CHEN Wei[4], SHAN Chunhui[3], GUO Zhuang[1,2], WANG Yurong[1,2]

1. *Brewing Technology Industrial College, Hubei University of Arts and Sciences, Xiangyang* 441053, *China*;

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

3. *School of Food Science and Technology, Shihezi University, Shihezi* 832003, *China*;

4. *Xinjiang Wuwu Liquor Industry Co., Ltd., Huyanghe* 830099, *China*

Abstract: MiSeq high-throughput sequencing and pure culture techniques were combined to analyze the microbial diversity of medicinal koji samples collected from Nanchang city, Jiangxi province, aiming to reveal the microbial composition within the koji. The results showed that the richness and diversity of bacterial taxa in the medicinal koji included in this study were significantly higher than those of the fungus. The dominant bacterial genera were *Pediococcus* and *Levilactobacillus*, with an average relative content of 38.04% and 13.00%, respectively. The dominant fungus genera were *Candida* and *Saccharomycopsis*, with an average relative content of 78.30% and 17.92%, respectively. Nine strains of bacteria isolated from medicinal koji were identified as three species: *Pediococcus pentosaceus*, *Pediococcus acidilactici*, and *Bacillus licheniformis*. Seven strains of fungus were identified as four species: *Saccharomycopsis fibuligera*, *Saccharomycopsis malanga*, *Pichia kudriavzevii*, and *Saccharomyces cerevisiae*.

Key words: medicinal koji; MiSeq high-throughput sequencing; pure culture; microbial diversity

[责任编辑: 杨晓娟 申慧珊]