

基于高通量测序技术对茅台镇酱香白酒主酿区域酵母菌群结构多样性的解析

罗方雯¹, 黄永光^{1,*}, 涂华彬², 胡峰², 尤小龙²

(1. 贵州大学酿酒与食品工程学院, 贵州省发酵工程与生物制药重点实验室, 贵州 贵阳 550025;

2. 贵州茅台酒厂(集团)习酒有限责任公司, 贵州 习水 564622)

摘要: 对茅台镇酱香白酒酿造的7个不同主酿区域的酿造环境及生产用大曲的酵母菌群多样性结构运用高通量测序技术进行解析, 共检出53种酵母属, 大曲中共检出33个属, 环境中共检出52种属。大曲中的优势酵母属为*Saccharomycopsis*和*Wickerhamomyces*, 环境中的优势酵母属为*Wickerhamomyces*、*Saccharomycopsis*、*Debaryomyces*和*Cryptococcus*。环境和曲之间的酵母属群落结构差异性显著, 环境中的酵母群落结构丰富度高于大曲。环境是酱香白酒酿造过程生产大曲中的酵母属的主要来源, 大曲中有96.97%的酵母属来自于环境。*Gibellulopsis*、*Filobasidium*、*Kuraishia*、*Agaricostilbum*、*Arachnomycetes*、*Bullera*、*Cystofilobasidium*、*Dioszegia*、*Erythrobasidium*、*Fellomyces*、*Yamadazyma*、*Eremothecium*、*Ballistisporomyces*、*Aessosporon*和*Kurtzmanomyces*为首次在酱香白酒酿造中检出并报道的酵母属。

关键词: 高通量测序; 酱香型白酒; 主酿区域; 酿造环境; 大曲; 酵母菌群结构多样性

Analysis of the Structure and Diversity of Yeast Community in Main Chinese Maotai-Flavor Liquor-Producing Areas of Maotai Town Using High-throughput Sequencing

LUO Fangwen¹, HUANG Yongguang^{1,*}, TU Huabin², HU Feng², YOU Xiaolong²

(1. Key Laboratory of Fermentation Engineering and Biological Pharmacy of Guizhou Province,

School of Liquor and Food Engineering, Guizhou University, Guiyang 550025, China;

2. Guizhou Moutai Brewery (Group) Xijiu Co. Ltd., Xishui 564622, China)

Abstract: In this paper, the structure and diversity of the yeast communities in the environment of 7 main Maotai-flavor liquor-producing areas in Maotai town, Guizhou province and in *Daqu* from these areas were analyzed using high-throughput sequencing. A total of 53 yeast genera were detected, of which, 33 were found in *Daqu*, and 52 in the environment. The dominant yeast genera in *Daqu* were *Saccharomycopsis* and *Wickerhamomyces*, while those in the environment were *Wickerhamomyces*, *Saccharomycopsis*, *Debaryomyces* and *Cryptococcus*. The structure of the yeast community in the environment was significantly different from that in *Daqu*, with the former being more abundant than the latter. The environment was the main source of yeast genera in *Daqu* during Maotai-flavor liquor brewing, 96.97% of the yeast genera in *Daqu* being originated from the environment. *Gibellulopsis*, *Filobasidium*, *Kuraishia*, *Agaricostilbum*, *Arachnomycetes*, *Bullera*, *Cystofilobasidium*, *Dioszegia*, *Erythrobasidium*, *Fellomyces*, *Yamadazyma*, *Eremothecium*, *Ballistisporomyces*, *Aessosporon* and *Kurtzmanomyces* were detected and reported for the first time during Maotai-flavor liquor brewing.

Keywords: high-throughput sequencing; Maotai-flavor liquor; main Chinese liquor-producing areas; brewing environment; *Daqu*; yeast community structure and diversity

DOI:10.7506/spkx-1002-6630-20190810-110

中图分类号: TS261.1; TS201.3

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630(2020)20-0127-07

收稿日期: 2019-08-10

基金项目: 贵州省科技支撑计划项目(201742920301120418); 贵州省重点基金项目(黔科合基础[2017]1405);

贵州省科技平台及人才团队计划项目(黔科合平台人才[2016]5637);

贵州省科技重大专项(黔科合重大专项字[2015]6012)

第一作者简介: 罗方雯(1994—)(ORCID: 0000-0002-2663-4859), 女, 硕士研究生, 研究方向食品生物工程和白酒微生物多样性。E-mail: 1444854395@qq.com

*通信作者简介: 黄永光(1976—)(ORCID: 0000-0002-6170-7718), 男, 研究员, 博士, 研究方向为酿酒微生物、酿酒工艺及酒体品质。E-mail: 772566120@qq.com

引文格式:

罗方雯, 黄永光, 涂华彬, 等. 基于高通量测序技术对茅台镇酱香白酒主酿区域酵母菌群结构多样性的解析[J]. 食品科学, 2020, 41(20): 127-133. DOI:10.7506/spkx1002-6630-20190810-110. <http://www.spkx.net.cn>

LUO Fangwen, HUANG Yongguang, TU Huabin, et al. Analysis of the structure and diversity of yeast community in main chinese Maotai-flavor liquor-producing areas of Maotai town using high-throughput sequencing[J]. Food Science, 2020, 41(20): 127-133. (in Chinese with English abstract) DOI:10.7506/spkx1002-6630-20190810-110. <http://www.spkx.net.cn>

酿酒行业素有“曲乃酒之骨”之说, 主要缘于大曲内丰富的微生物群落及酶系为白酒酿造及其酒体提供香味及其前体物质, 进而对白酒品质产生重要影响^[1]。酵母菌类是发酵之母, 是乙醇发酵的主要动力和产香来源, 产酒酵母主要影响酒的产量, 同时一些生香酵母能产生酸、酚、芳香和酮类等风味化合物, 进而对酒体的风格形成具有重要作用^[2], 酵母菌类多在白酒酿造过程有检出^[3]。高温制曲是酱香型白酒酿造的一大工艺特色, 大曲不但培养时间长, 且培养温度高, 曲块在经过40 d的堆积发酵过程, 制曲温度高达58~65℃。酵母菌因耐温特性受限, 主要集中于制曲的前期和高温堆积发酵的前期。在制曲前期, 酵母菌含量一般为2%~5%, 中后期由于58~65℃的高温, 酵母菌逐渐死亡^[4]。Liu Xiu等^[5]采用巢式聚合酶链反应-变性梯度凝胶电泳(polymerase chain reaction-denaturing gradient gel electrophoresis, PCR-DGGE)方法研究了茅台大曲成型、成熟和干燥过程中微生物的多样性变化, 结果显示茅台大曲中有大量细菌、酵母菌和霉菌存在; 同样Wang Chaolu等^[6]用纯培养研究了茅台大曲中的微生物, 也揭示大曲含有丰富的细菌、霉菌和酵母菌特征。这些研究结果均表明酱香大曲蕴含丰富的微生物资源, 也是制酒过程的微生物主要来源。

业内常有“离开茅台镇, 就酿不出茅台酒”的说法。同时, 白酒企业新厂扩建时经常发生酒质量不如老厂区的现象^[7], 这些现象都表明环境微生物对白酒酿造的重要性。酱香型白酒酿造属于开放式发酵; 开放式制曲通过自然接种, 网罗、富集、培养微生物, 高温堆积发酵过程糟醅可充分网罗、捕集生产环境(空气、工具、场地、生产用水等)中的大量微生物, 这是富集有益微生物(特别是酵母菌)的重要工序和关键环节, 又称“二次制曲”。因此, 对酿造环境微生物的研究和解析对酱香白酒酿造具有举足轻重的意义。

传统分离方法的结果仅依赖于形态、生理生化特性进行分类和鉴定, 且分离培养的微生物仅占微生物总数的0.1%~10%^[8]。因此, 应用传统可培养方法对白酒酿造过程中酵母菌群多样性的认识不够全面深入, 也不能全面反映酿造过程酵母菌群结构的真实性。随着分子生物学的发展, 越来越多免培养技术运用于解析复杂微生物态结构中的菌群多样性特征。本实验通过高通量测序结合数理统计系统分析了茅台镇酱香型白酒主酿区域酿造

环境及其生产大曲中的酵母菌群结构的多样性特征, 并进一步研究其在发酵过程中的变化规律及调控机制, 以期丰富酱香型白酒酿造酵母菌群结构的研究。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

茅台酒样品取自贵州省仁怀市茅台镇观音寺区、上坪村、椿树村、岩滩村、向阳村、卢荣坝村及合马镇街道社区共7个酿造酱香型白酒的不同主酿区域, 17个代表性酿酒企业的酿造环境和生产用大曲样品。环境取样点包括: 酒厂生产车间的窗户玻璃表面, 窗台上, 车间四周墙体表面, 晾堂地面、墙角, 行车梯子及梁柱表面, 配电箱及消防箱表面, 尾酒罐表面及车间外地面等。取样时间为2018年1—9月, 茅台镇酱香型白酒酿造1~7轮次酿造生产的堆积发酵期。在每个采样企业的样品采集点, 每一轮次均为固定的同一采样点。按照设置的区域划分, 将从每个酒厂采集的样品采用等量混合为该区域的综合样(研究实验分析样品, 代表该区域的综合样品)。每轮次采集样品现场采集后匀密封袋、专用箱转运, 运回实验室分析, 并留存样低温保存。

DNA Marker、磷酸盐缓冲溶液(phosphate buffer saline, PBS)、引物合成 上海生物工程股份有限公司; E.Z.N.A.® Soil DNA Kit 美国Omega BioTek公司; 异丙醇(分析纯) 贵州博奥瑞杰生物科技有限公司; TEA缓冲液 北京索莱宝科技有限公司; 琼脂糖 南京生兴生物技术有限公司; Goldview染料 上海赛百盛有限公司; rTaq DNA聚合酶试剂盒 北京全式金生物技术有限公司; AxyPrep DNA凝胶回收试剂盒 美国AXYGEN公司。

1.2 仪器与设备

Zealway G154DW高压蒸汽灭菌锅 致微(厦门)仪器有限公司; 台式高速冷冻离心机 德国Sigma公司; GeneAmp® 9700型PCR仪 美国ABI公司; DYY-8C型电泳仪 北京六一仪器厂; JS-680C凝胶成像仪 上海培清科技有限公司; MiSeq测序仪 美国Illumina公司。

1.3 方法

1.3.1 样品预处理及DNA提取^[9-10]

分别取1.1节1~7轮次最后混匀的综合样各16 g于

100 mL离心管中,用30 mL灭菌后的0.1 mol/L PBS悬浮,加入3~5颗玻璃珠,旋涡振荡7 min,400 r/min离心5 min,取上清液。将离心得到沉淀用PBS洗涤,旋涡振荡4 min,400 r/min离心5 min,收集上清液,重复该步骤一次。收集全部上清液于12 000 r/min离心5 min,弃去上清液,收集细胞沉淀。预处理结束后,根据E.Z.N.A.® Soil DNA Kit的操作说明提取各样品中的微生物总DNA。

1.3.2 16S rDNA 基因扩增及Illumina MiSeq测序

使用16S rDNA通用真菌引物ITS1F (5'-CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA-3')和ITS2R (5'-GCTGCGTTCTTCATCGATGC-3')对真菌ITS1F-ITS2R区域进行扩增。PCR体系及反应条件见黄蕴利等^[11]的方法。每个样本做3个重复。将同一样品的PCR产物混合后用1.1%琼脂糖凝胶电泳检测,使用AxyPrep DNA凝胶回收试剂盒切胶回收PCR产物,Tris-HCl洗脱;1.1%琼脂糖电泳检测。参照电泳初步定量结果,将PCR产物用QuantiFluor TM-ST蓝色荧光定量系统(Promega公司)进行检测并定量,再按照每个样本的测序量要求,进行相应比例的混合。连接“Y”字形接头,使用磁珠筛选去除接头自连片段,利用PCR扩增进行文库模板富集,氢氧化钠变性,产生单链DNA片段,制备MiSeq PE文库。再在Illumina MiSeq (PE300)平台上机测序^[9]。

1.4 数据分析

采用WPS 2019进行数据统计计算,Origin 8.6绘制堆积柱状图,TBtool绘制热谱图,R语言绘制群落差异分析图。

2 结果与分析

2.1 主酿区域环境及大曲中酵母菌群多样性结构分布

表1 本实验检出结果与其他文献报道酵母属对比分析结果
Table 1 Comparative analysis of the results of this study and literature reports on yeast genera involved in Maotai-flavor liquor brewing

酵母属	其他研究者	酵母属	其他研究者
		<i>Kwoniella</i>	张世伟等 ^[18]
<i>Saccharomyces</i> , <i>Zygosaccharomyces</i> , <i>Geotrichum</i> , <i>Millerozyma</i> , <i>Trichomonascus</i> , <i>Trichosporon</i> , <i>Cystobasidium</i> , <i>Cyberlindnera</i> , <i>Candida</i>	郝飞等 ^[12]	<i>Erythrobasidium</i> , <i>Leucosporidiella</i>	王宗敏 ^[19]
<i>Cryptococcus</i> , <i>Malassezia</i> , <i>Sporobolomyces</i> , <i>Wickerhamomyces</i> , <i>Kazachstania</i> , <i>Meyerozyma</i> , <i>Saccharomycopsis</i> , <i>Guehomyces</i> , <i>Pichia</i>	郭敏 ^[13]	<i>Lodderomyces</i> , <i>Rhodospiridium</i>	王晓丹等 ^[20]
<i>Rhodotorula</i> , <i>Sterigmatomyces</i> , <i>Schwannomyces</i> , <i>Kodamaea</i> , <i>Debaryomyces</i> , <i>Arthrographis</i>	尚柯 ^[14]	<i>Williopsis</i> , <i>Torulaspora</i>	李婷 ^[21]
<i>Gibellulopsis</i>	任志敏等 ^[15]	<i>Symbiotaphrina</i>	王海燕等 ^[22]
<i>Filobasidium</i>	牟穰 ^[16]	<i>Komagataella</i>	张武斌 ^[23]
<i>Kluyveromyces</i>	孙神英 ^[17]	<i>Hannaella</i> , <i>Tetrapisispora</i>	戴奕杰等 ^[24]
		<i>Kuraishia</i> , <i>Agaricostilbum</i> , <i>Arachnomyces</i> , <i>Bullera</i> , <i>Cystofilobasidium</i> , <i>Dioszegia</i> , <i>Erythrobasidium</i> , <i>Fellomyces</i> , <i>Yamadazyma</i> , <i>Eremothecium</i> , <i>Ballistisporomyces</i> , <i>Aessosporon</i> , <i>Kurtzmanomyces</i> , unclassified- <i>Saccharomycetes</i> , unclassified- <i>Saccharomycetaceae</i>	未检出, 未报道过酵母属

对高通量测序结果进行统计分析,从茅台镇酱香白酒主酿区域共检出酵母属53种。环境中共检出酵母属52种,大曲中共检出酵母属33种。表1为本实验检出结果与其他研究者报道的酵母属结果的比较分析。

郝飞^[12]、郭敏^[13]、王晓丹^[20]、戴奕杰^[24]等从酱香型白酒酿造过程中共检出*Trichomonascus*、*Cyberlindnera*、*Saccharomyces*、*Zygosaccharomyces*、*Geotrichum*、*Millerozyma*、*Trichosporon*、*Candida*、*Saccharomycopsis*、*Pichia*、*Cryptococcus*、*Malassezia*、*Sporobolomyces*、*Wickerhamomyces*、*Kazachstania*、*Meyerozyma*、*Saccharomycopsis*、*Torulaspora*、*Guehomyces*、*Tetrapisispora*、*Hannaella*、*Williopsis*等酵母属。*Gibellulopsis*在发酵奶酒中有发现^[15],牟穰^[16]在黄酒酿造过程检出*Filobasidium*,但在白酒酿造中鲜见有该2种酵母属的相关报道。本研究中,存在unclassified-*Saccharomycetes*和unclassified-*Saccharomycetaceae*未能清晰定性到属种,正在进一步解析研究。通过与其他研究者所检出酵母属比较,在本研究中发现*Gibellulopsis*、*Filobasidium*、*Kuraishia*、*Agaricostilbum*、*Arachnomyces*、*Bullera*、*Cystofilobasidium*、*Dioszegia*、*Erythrobasidium*、*Fellomyces*、*Yamadazyma*、*Eremothecium*、*Ballistisporomyces*、*Aessosporon*、*Kurtzmanomyces*为首次从酱香型白酒酿造环境中检出的酵母属,进一步丰富了酿造酵母资源。

2.2 主酿区域产高温大曲内酵母菌群多样性结构

运用WPS 2019对7个主酿区域生产用大曲中酵母菌的高通量测序结果进行统计分析,从7个主酿区域的生产用大曲中共检出33种酵母属,见图1。

从图1可以看出,各主酿区域生产大曲中占优势地位的酵母属为*Saccharomycopsis*和*Wickerhamomyces*,其中*Saccharomycopsis*为各区域大曲中的绝对优势酵母属。7个区域的生产使用大曲在酵母属上分布相差不明显,且各区域优势酵母属无明显区别,表明茅台镇酱香型白酒各区域生产及使用大曲在微生物结构组成上基本保持一致,具有相对稳定性。其中,*Saccharomycopsis*相对丰度除在区域6为61.245%外,在其他区域都高达85%,平均相对丰度为87.66%,为各区域大曲的绝对优势酵母属。*Wickerhamomyces*位居第2,在区域6相对丰度最高为26.80%,平均相对丰度为8.26%,各区域生产使用大曲的酵母属在相对丰度上出现差异,可能是由于各区域的地理位置不同导致。*Candida*、*Millerozyma*和*Trichomonascus*平均相对丰度均大于0.2,其余酵母属的相对丰度在各主酿区域都较低,其原因可能是这些酵母的含量在大曲中相对于上述酵母属低,即使达到高通量检出的阈值,但由于含量太低,导致检出的丰度也低。

郭敏^[13]研究了酱香大曲微生物,在第1、2次翻曲以及大曲出房时期均检出*Wickerhamomyces*,且相对丰度都较高,与本研究结论一致。王晓丹^[20]、Wu^[25]等的研究表明*S. fibuligera*和*P. anomala*在酱香大曲中处于优势地位,也与本研究结论一致。蒋思峡^[26]在酱香大曲中检出5个酵母属,分别为*Cryptococcus*、*Lodderomyces*、*Pichia*、*Saccharomyces*、*Saccharomycopsis*,并表明*S. fibuligera*在成品曲中广泛存在。陈美竹^[27]结合传统鉴定方法和现代分子生物学手段,从酱香型白酒生产过程检出酵母9个属,主要属是*Debaryomyces*、*Saccharomycopsis*、*Trichosporon*、*Schizosaccharomyces*、*Saccharomyces*、*Pichia*、*Candida*和*Issatchenkia*。

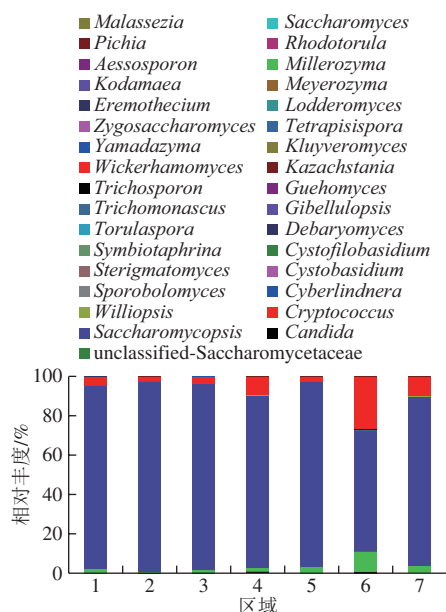


图1 主酿区域大曲酵母菌群多样性结构在属水平上的分布

Fig. 1 Distribution of yeast community composition in Daqu at genus level

罗方雯等^[28]对7个主酿区域酱香大曲中的酵母菌进行了可培养及分离鉴定,其中*W. anomalus*和*S. fibuligera*在各区域中的相对数量较高,平均相对数量分别达到41.73%和8.18%,且在各主酿区域均分离到。可培养结果与本实验高通量的检出结果存在一定差异,在可培养中*W. anomalus*占绝对优势,而*S. fibuligera*次之,与高通量的结果恰好相反,这与2种检测方法的原理及其2种菌属的生物学特性均有关,但2种酵母属均是大曲中的优势属。结合其他研究者的研究结论,本实验利用高通量解析,从酿造用高温大曲中检出的酵母属种类最多,且大曲的优势酵母属为*Wickerhamomyces*和*Saccharomycopsis*。其中,*Cystofilobasidium*、*Gibellulopsis*、*Yamadazyma*、*Eremothecium*和*Aessosporon*为首次从酱香大曲中检出的酵母属,进一步丰富了酱香大曲酵母菌的研究结果。

2.3 主酿区域环境酵母菌群结构多样性分布

运用WPS 2019对7个主酿区域酿造环境样品中酵母属的高通量测序结果进行数据统计分析,从环境中共检出52种酵母属(图2)。

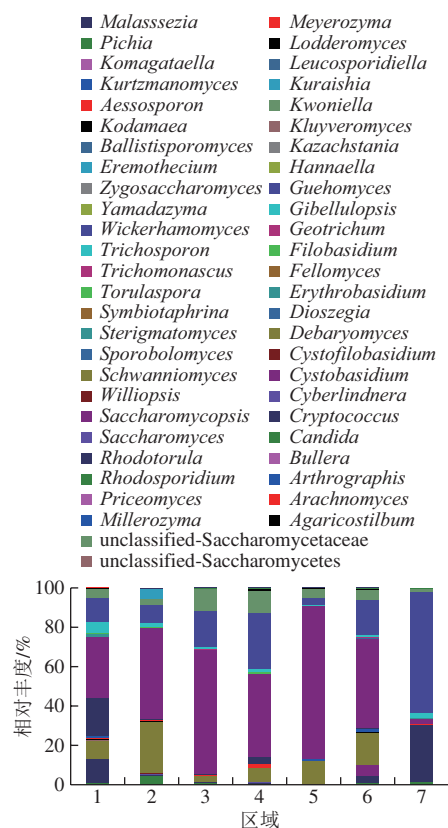


图2 酿造环境中酵母菌群多样性结构在属水平上的分布

Fig. 2 Distribution of yeast community composition in environment at genus level

从图2可知,*Saccharomycopsis*在各主酿区域都有检出,在区域7的相对丰度较小为2.938%,在其余区域相对丰度均高于30%;其次为*Wickerhamomyces*和*Debaryomyces*,*Wickerhamomyces*在区域6相对丰度为26.797%,平均相对丰度为21.54%,*Debaryomyces*在区域2中相对丰度最高为26.392%,平均相对丰度为10.67%。其中,*Wickerhamomyces*在区域7的相对丰度最高,而*Saccharomycopsis*相对丰度却较少,与其他区域结果相反,这2种酵母菌之间的相互作用机制有待进一步考究。其余相对丰度大于6%的酵母属有*Cryptococcus*(6.82%)和*unclassified-Saccharomycetaceae*(6.01%),检出频率都为100%。区域1~6的绝对优势酵母属为*Saccharomycopsis*,而区域7的优势酵母属为*Wickerhamomyces*和*Cryptococcus*,其原因可能是由于区域7的环境更适合这2种酵母菌生长。从图2还可看出,区域2和区域6中的酵母属的多样性丰富度高于其他5个区域,其原因同样可能是不同环境气候条件的细微差异所

致,这也可能是导致各区域酿出基酒的酒体风格存在细微差异的原因。茅台技术中心对其酱香白酒酿造环境及其酒厂周边生态环境中的微生物开展全面普查,从中检出11种酵母^[29]。张亚丽^[30]从茅台镇空气中分离出16种酵母菌,分属于10个不同的属,且从4个季节的空气中均分离到*Saccharomycopsis*。王彦华^[31]对福矛窖酒酿造车间空气的微生物开展研究,得出酿造车间空气样本中的酵母菌种属较少,其中*Sterigmatomyces*含量相对较多,其次为*Rhodosporidium*和*Trichosporon*。在茅台镇4个季节空气中均分离到*Saccharomycopsis*,而在福矛窖酒酿造车间空气样本中并未发现该属,说明不同地域的酿造环境对白酒酿造微生物的富集存在差异。同样茅台镇不同地域酿造环境和生产使用大曲在微生物的组成和相对丰度存在差异,进一步说明茅台镇不同酿造区域对酿造微生物的富集存在差异。

罗方雯等^[28]对相应环境样品中的酵母菌开展了可培养和分离鉴定,结果表明*Wickerhamomyces*在环境中的相对数量较高,平均相对数量占比高达31.13%,*Cryptococcus*为5.08%,且在各区域均有分离检出;*Saccharomycopsis*的相对数量较少,平均相对数量占比只有1.68%,与高通量结果存在一定的差异。由于目前对茅台镇酱香白酒主酿区域环境中的酵母菌研究非常少,且大多都缺乏系统性。将其他研究者的结论结合本课题高通量分析结果,初步确定茅台镇酱香型白酒酿造区域环境的优势酵母属为*Wickerhamomyces*、*Debaryomyces*、*Saccharomycopsis*和*Cryptococcus*;且本研究过程从主酿区域环境中所检测的酵母属的多样性特征明显,新检出发现*Agaricostilbum*、*Arachnomycetes*、*Bullera*、*Cystofilobasidium*、*Dioszegia*、*Erythrobasidium*、*Fellomyces*、*Filobasidium*、*Gibellulopsis*、*Kuraishia*、*Yamadazyma*、*Eremothecium*、*Ballistisporomyces*、*Aessosporon*和*Kurtzmanomyces*,这些酵母属在酱香白酒酵母菌的研究中未有过相关报道。

2.4 主酿区域生产大曲和酿造环境的酵母菌群多样性差异

比较环境和大曲中酵母菌属的多样性结构特点(图3),可看出酵母菌属在环境和大曲之间的差异性较显著,环境的酵母多样性丰富度明显高于大曲。其中,酵母属*Gibellulopsis*、*Yamadazyma*、*Zygosaccharomyces*、*Saccharomycopsis*、*Trichomonascus*、*Wickerhamomyces*、*Kluyveromyces*和*Williopsis*相对丰度在环境和大曲中保持一致。酵母属*Agaricostilbum*、*Arachnomycetes*、*Arthrographis*、*Bullera*、*Dioszegia*、*Erythrobasidium*、*Fellomyces*、*Filobasidium*、*Geotrichum*、*Hannaella*、*Kwoniella*、*Kuraishia*、*Leucosporidiella*、*Priceomyces*、*Rhodosporidium*、*Schwanniomyces*、*unclassified-Saccharomycetaceae*、*Ballistisporomyces*、

*Kurtzmanomyces*和*Komagataella*在大曲中未检出,在环境中单独检出;而酵母属*Tetrapisispora*在环境中未检出,在大曲中单独检出。酵母属*Cryptococcus*、*Cyberlindnera*、*Cystobasidium*、*Cystofilobasidium*、*Debaryomyces*、*Guehomyces*、*Kazachstania*、*Lodderomyces*、*Meyerozyma*、*Rhodotorula*、*Sporobolomyces*、*Sterigmatomyces*、*Symbiotaphrina*、*Torulaspora*、*Trichosporon*、*Eremothecium*、*Kodamaea*、*Aessosporon*、*Pichia*和*Malassezia*在环境中的相对丰度优于大曲,相反*unclassified-Saccharomycetes*、*Milleriozyma*和*Saccharomyces*等菌属在大曲中的相对丰度优于环境。进一步说明酿造环境与酿造大曲的酵母菌群在种属类别多样性上存在明显差异。

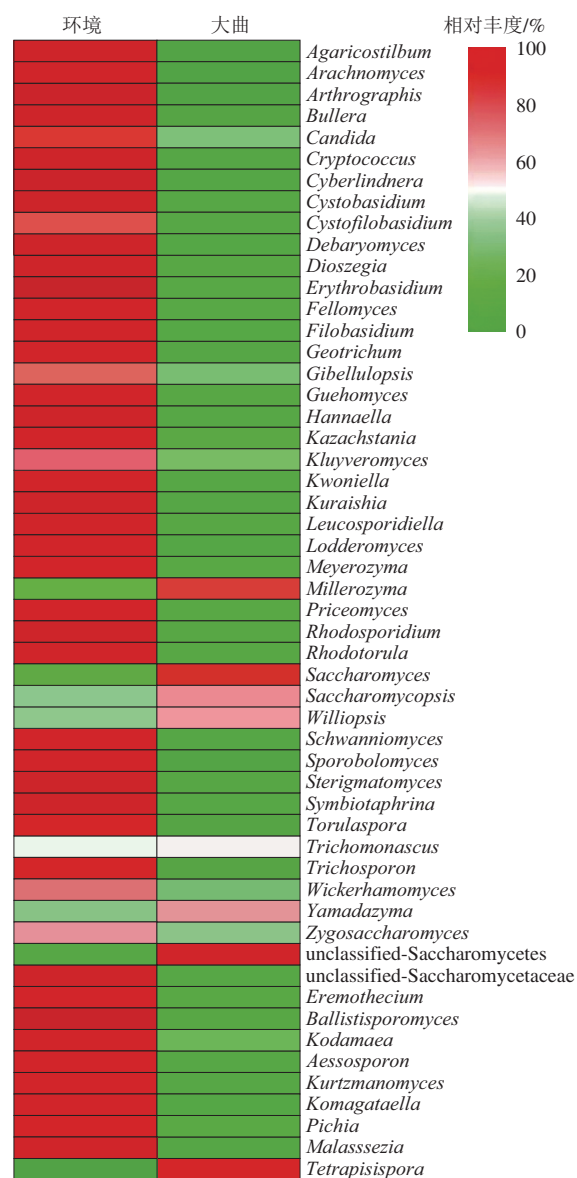


图3 环境、大曲中主要酵母属多样性丰度热图

Fig. 3 Heatmap showing the diversity and abundance of major yeast genera in environment and Daqu

Venn图分析可直观反映酿造环境与生产用大曲在酵母菌群结构多样性方面的共有种群及特有种群的特征性(图4)。所有样品中共检出53种酵母属,环境中共检出52种酵母属,大曲共检出33种酵母属,大曲中有96.97%的酵母属来自环境;在环境中检出而未在大曲中检出的酵母属有20种,在大曲中检出未在环境中检出的酵母属只有1种。结合图1~4,明显看出环境酵母群落结构多样性丰富度显著高于大曲,大曲中的绝大多数酵母菌属来自环境,由环境迁移进入大曲,这可能是由于大曲在存放过程中不断网罗、富集环境中的酵母菌所致。酱香型白酒生产使用大曲属于高温曲,其制作过程中温度高达65℃左右,酵母几乎被淘汰,其发酵力很弱。生产过程酵母的来源主要靠大曲贮存过程和堆积发酵过程网罗空气中、场地上的微生物获得,进一步证实酱香白酒酿造过程生产大曲贮存6个月非常必要。而在大曲中检出但未在环境中检出的1种酵母属,更大的可能性是由于其在环境中含量很少,大曲在存放过程中从环境吸收后使其得到了富集培养,从而达到了高通量的检出限。

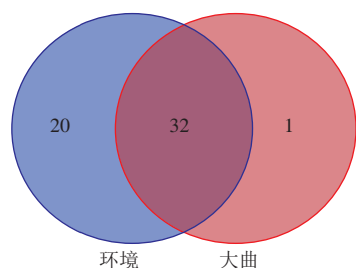


图4 环境、大曲酵母属水平分布Venn图

Fig. 4 Venn diagram of the horizontal distribution of yeast genera in environment and Daqu

3 结论

对茅台镇酱香白酒酿造的7个不同主酿区域的酿造环境及生产用大曲的酵母菌群多样性结构运用高通量测序技术进行解析,共检出53种酵母属;其中从大曲样品中共检出33种,环境样品中共检出52种属。结果表明,主酿区域酱香大曲的优势酵母属为*Saccharomycopsis*和*Wickerhamomyces*,其中*Cystofilobasidium*、*Gibellulopsis*、*Yamadazyma*、*Eremothecium*和*Aessosporon*为首次从酱香大曲中检出;环境的优势酵母属为*Wickerhamomyces*、*Saccharomycopsis*、*Debaryomyces*和*Cryptococcus*,其中*Agaricostilbum*、*Arachnomyces*、*Bullera*、*Dioszegia*、*Erythrobasidium*、*Fellomyces*、*Filobasidium*、*Kuraishia*、*Ballistisporomyces*和*Kurtzmanomyces*在酱香白酒研究中未有过相关报道。

环境和大曲之间的酵母菌群落结构差异性显著,环境的酵母属多样性高于大曲。其中,*Gibellulopsis*、*Yamadazyma*、*Zygosaccharomyces*等8种酵母属相对丰度在环境和大曲中保持相对一致;而*Cryptococcus*、*Cyberlindnera*、*Cystobasidium*和*Cystofilobasidium*等20种酵母属在环境中的相对丰度优于大曲,相反*unclassified-Saccharomycetes*、*Millerozyma*和*Saccharomyces*等酵母属在大曲中的相对丰度优于环境。其中,*Agaricostilbum*、*Arachnomyces*和*Arthrographis*等20种酵母属只在环境中检出未在大曲中检出,而*Tetrapisispora*只在大曲中检出未在环境中检出。大曲中的酵母属有96.97%来自于环境,进一步说明环境是酱香白酒酿造过程中的主要微生物来源。对环境和环境之间的酵母菌群多样性进行系统的相似性和差异性比较,解析了茅台镇酱香白酒主酿区域环境和大曲之间酵母菌的差异性特征,确定了环境是茅台镇酱香白酒发酵过程中的主要微生物来源。本研究对茅台镇酱香白酒主酿区域环境和酱香大曲之间酵母属结构的分布、相似性以及差异性进行系统的分析,在一定程度上丰富了酱香型白酒酿造过程中酵母菌资源。

参考文献:

- [1] 秦臻,郑佳,彭昱雯,等.生物标记法剖析传统酿造用大曲微生物群落结构[J].食品科学,2011,32(11):165-170. DOI:10.7506/spkx1002-6630-201111036.
- [2] 沈怡方.白酒生产技术全书[M].北京:中国轻工业出版社,2013.
- [3] 陈美竹,邱树毅,胡宝东,等.酱香型白酒酿造体系中酵母菌研究进展[J].中国酿造,2015,34(6):5-10. DOI:10.11882/j.issn.0254-5071.2015.06.002.
- [4] 黄永光,黄旭,黄平.茅台酒酿酒极端环境与极端酿酒微生物[J].酿酒科技,2006(12):47-50. DOI:10.13746/j.njkj.2006.12.012.
- [5] LIU X, GUO K L, ZHANG H X. Determination of microbial diversity in Daqu, a fermentation starter culture of Maotai liquor, using nested PCR-denaturing gradient gel electrophoresis[J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2012, 28: 2375-2381. DOI:10.1007/s11274-012-1045-y.
- [6] WANG C L, SHI D J, GONG G L. Microorganisms in Daqu: a starter culture of Chinese Maotai-flavor liquor[J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2008, 24: 2183-2190. DOI:10.1007/s11274-008-9728-0.
- [7] AMANN R I. Phylogenetic identification and *in situ* detection of individual microbial cells without cultivation[J]. Microbiological Reviews, 1995, 59(1): 143-169. DOI:10.1016/S0882-4010(95)90076-4.
- [8] 王雪山.不同环境清香类型白酒发酵微生物种群结构比较及溯源解析[D].无锡:江南大学,2018.
- [9] 胡小霞,黄永光,蒋想,等.清酱香型白酒陶坛发酵细菌群落结构多样性研究[J].食品科学,2020,41(8):130-138. DOI:10.7506/spkx1002-6630-20190314-175.
- [10] 王雪山,杜海,徐岩.清香型白酒发酵过程中微生物种群空间分布[J].食品与发酵工业,2018,44(9):1-8. DOI:10.13995/j.cnki.11-1802/ts.017334.

- [11] 黄蕴利, 黄永光, 胡建峰, 等. 酱香型白酒第二轮次酒发酵过程微生物多样性研究[J]. 中国酿造, 2017, 36(9): 30-35. DOI:10.11882/j.issn.0254-5071.2017.09.007.
- [12] 郝飞, 吕锡斌, 吴耀领, 等. 酱香型白酒酿造酒醅中酵母菌多样性研究[J]. 菌物学报, 2019, 38(5): 620-630. DOI:10.13346/j.mycosystema.180313.
- [13] 郭敏. 基于高通量测序对酱香大曲制曲微生态多样性的研究[D]. 贵阳: 贵州大学, 2018.
- [14] 尚柯. 酱香型白酒高温堆积工艺机理的初步研究[D]. 乌鲁木齐: 新疆农业大学, 2016.
- [15] 任志敏, 陈忠军, 孙子羽, 等. 传统发酵奶酒的研究进展[J]. 中国酿造, 2018, 37(7): 17-21. DOI:10.11882/j.issn.0254-5071.2018.07.004.
- [16] 牟穰. 清爽型黄酒酿造微生物群落结构及其与风味物质相关性研究[D]. 无锡: 江南大学, 2015.
- [17] 孙神英. 不同酵母菌对白酒风味成分的影响[D]. 武汉: 武汉轻工大学, 2014.
- [18] 张世伟, 陈曦, 钟其顶, 等. 不同品种酿酒葡萄表皮微生物群落多样性分析[J]. 生物技术通报, 2017, 33(3): 128-137. DOI:10.13560/j.cnki.biotech.bull.1985.2017.03.019.
- [19] 王宗敏. 镇江香醋醋酸发酵阶段菌群结构变化与风味物质组成之间的相关性研究[D]. 无锡: 江南大学, 2016.
- [20] 王晓丹, 陈美竹, 邱树毅, 等. 茅台大曲中酵母的分、鉴定及其功能初探[J]. 食品科学, 2017, 38(4): 51-57. DOI:10.7506/spkx1002-6630-201704009.
- [21] 李婷. 川南白酒窖池中产酯酵母的筛选及其葡萄酒增香酿造的潜力分析[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2017.
- [22] 王海燕, 唐洁, 徐岩, 等. 清香型小曲白酒中微生物组成及功能微生物的分析[J]. 酿酒科技, 2012(12): 48-52. DOI:10.13746/j.njkj.2012.12.043.
- [23] 张武斌. 清香大曲糖化酶的提取及宏蛋白质组学分析[D]. 临汾: 山西师范大学, 2014.
- [24] 戴奕杰, 李宗军, 田志强. 酱香型白酒大曲和糟醅的真菌多样性分析[J]. 现代食品科技, 2018, 34(7): 97-104. DOI:10.13982/j.mfst.1673-9078.2018.7.015.
- [25] WU Q, XU Y, CHEN L Q. Diversity of yeast species during fermentative process contributing to Chinese Maotai-flavour liquor making[J]. Letters in Applied Microbiology, 2012, 55(4): 301-307. DOI:10.1111/j.1472-765X.2012.03294.x.
- [26] 蒋思峡. 传统与机械化酱香大曲的菌群结构分析[D]. 贵阳: 贵州大学, 2017.
- [27] 陈美竹. 酱香白酒大曲与酿造过程酵母动态变化研究[D]. 贵阳: 贵州大学, 2016.
- [28] 罗方雯, 黄永光, 涂华彬. 茅台镇酱香白酒不同酿造区域可培养酵母种群结构多样性分析[J]. 食品科学, 2020, 41(12): 143-149. DOI:10.7506/spkx1002-6630-20190430-292.
- [29] 范光先, 王和玉, 崔同弼, 等. 茅台酒生产过程中的微生物研究进展[J]. 酿酒科技, 2006(10): 75-77. DOI:10.13746/j.njkj.2006.10.055.
- [30] 张亚丽. 贵州省仁怀地区茅台空气微生物的鉴定与分析[D]. 北京: 北京化工大学, 2014.
- [31] 王彦华. 福矛窖酒酿造环境微生物区系结构分析[D]. 福州: 福建师范大学, 2016.