

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

罗方雯¹, 黄永光^{1,*}, 涂华彬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: 开展茅台镇酱香型白酒不同酿造区域可培养酵母种群结构多样性研究, 探索环境与大曲中酵母种群结构的多样性特征。通过样品采集、可培养酵母分离和26S rDNA鉴定, 从环境和大曲样品中共分离获得568株酵母菌, 共送检202株酵母。其中从环境样品中共分离334株酵母, 鉴定为14个属、25个种以及1株uncultured yeast; 从大曲中共分离223株酵母, 鉴定为12个属、20个种以及1株uncultured fungus。环境和大曲共有10种相同酵母菌种群; 环境中主要优势种酵母为*Wickerhamomyces anomalus*、*Saccharomyces cerevisiae*和*Hyphopichia burtonii*; 大曲的主要优势种为*W. anomalus*和*Saccharomycopsis fibuligera*。环境和大曲中的酵母在数量上多样性明显, 但酵母在种水平上多样性不明显。其中, *Nectaromyces rattus*、*Wickerhamomyces* sp. H1Y23、*Issatchenkia* sp. S612Y5、*Wickerhamomyces pijperi*、*Trichosporon faecale*、*Kazachstania* sp. IMB190R、*Pseudozyma* sp.、*Kazachstania solicola*、*Torulaspora* sp. Z8Y10和*Helicoceras oryzae*为首次从酱香型白酒酿造过程中分离获得的酵母菌株。

关键词: 酱香型白酒; 酿造区域环境样品; 大曲; 酵母种群结构多样性

Structure and Diversity of Culturable Yeast Populations in Different Maotai-flavor Liquor Brewing Regions of Maotai Town, Guizhou Province

LUO Fangwen¹, HUANG Yongguang^{1,*}, TU Huabin²

(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: The structure and diversity of cultural yeast populations in different Maotai-flavor liquor brewing regions of Maotai town, Guizhou province were studied. Yeast samples were collected from the brewing environment and the fermentation starter, *Daqu*. A total of 568 yeast strains were obtained and identified by 26S rDNA gene sequencing, 334 of which came from the brewing environment and identified as 25 species and 1 uncultured yeast strain in 14 genera, while the remaining 223 were derived from *Daqu* were identified as 20 species and 1 uncultured fungal strain in 12 genera. Ten yeast populations were common to both. The dominant species in the environment were *Wickerhamomyces anomalus*, *Saccharomyces cerevisiae* and *Hyphopichia burtonii* while those in *Daqu* were *W. anomalus* and *Saccharomycopsis fibuligera*. The diversity of yeast in the environment and *Daqu* was significant quantitatively but at the species level. To our knowledge, this study is the first to isolate *Nectaromyces rattus*, *Wickerhamomyces* sp. H1Y23, *Issatchenkia* sp. S612Y5, *Wickerhamomyces pijperi*, *Trichosporon faecale*, *Kazachstania* sp. IMB190R, *Pseudozyma* sp., *Kazachstania solicola*, *Torulaspora* sp. Z8Y10 and *Helicoceras oryzae* from the Maotai-flavor liquor brewing process.

Keywords: Maotai-flavor liquor; environmental samples from brewing regions; *Daqu*; yeast population structure diversity

DOI:10.7506/spkx1002-6630-20190430-292

中图分类号: TS261.1; TS201.3

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630(2020)12-0143-07

收稿日期: 2019-04-30

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, 研究方向为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. 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. <http://www.spkx.net.cn>

LUO Fangwen, HUANG Yongguang, TU Huabin. Structure and diversity of culturable yeast populations in different Maotai-flavor liquor brewing regions of Maotai town, Guizhou province[J]. Food Science, 2020, 41(12): 143-149. (in Chinese with English abstract) DOI:10.7506/spkx1002-6630-20190430-292. <http://www.spkx.net.cn>

酱香白酒属于固态发酵,是多微混菌的开放式发酵过程,在多种微生物菌群相互调控作用下形成独特的发酵体系和酒体风格^[1],其特殊的酒体风格在于其独特酿造工艺及酿造环境所形成的特殊微生物区系^[2]。其微生物区系包括细菌、酵母、霉菌等菌群结构的演替^[3]。其中,酵母不仅能发酵糖类产生乙醇,而且能代谢产生丰富的风味成分,如生香酿酒酵母和假丝酵母等;再如在不同发酵条件下,毕赤酵母可以产生醇、酯、酸等多种风味物质^[4-6],从而影响白酒的产品味感和风味特征。

大曲是一种糖化发酵剂,富含多种酶类和菌类,素有“曲为酒之骨”的说法^[7],酱香大曲更是与产品风味特征密切相关的发酵剂和酿造原料^[8]。有研究^[9]认为高温制曲不利于酵母生长,在曲胚出房收曲时检出酵母很少,甚至检不出酵母。但通过聚合酶链式反应-变性梯度凝胶电泳(polymerase chain reaction-denaturing gradient gel electrophoresis, PCR-DGGE)手段对生产之前的高温大曲研究发现,大曲中存在大量酵母,数量可达 $10^3 \sim 10^4$ CFU/g^[10]。这可能与大曲在贮存、使用过程富集环境中的酵母有关。胡晓龙^[11]研究发现大曲中的微生物可来源于制曲原材料、空气、场地、曲房、器具及覆盖物等;Wang Qiang等^[3]通过DGGE研究表明茅台酒发酵酒醅中微生物来自大曲、窖泥、高粱、空气及地面微生物;吴徐建^[12]分析酱香大曲与酿造过程中的酵母,发现大曲中的酵母进入了发酵过程,但远不及环境中酵母对酿造过程的贡献。范光先等^[13]从茅台酒厂周边生态环境中分离鉴定出11种酵母。张亚丽^[14]从茅台镇空气中分离出16种酵母。吴徐建^[12]从酱香型白酒酿造2~7轮次的环境、大曲以及酒醅中共分离获得21种菌落形态各异的酵母,通过比较酿造环境、大曲、酒醅中的酵母相似性,发现空气中存在的酵母种属与大曲中的酵母种属基本一致。以往研究可看出酿造环境及其微生物生态结构对大曲酵母菌群结构、白酒酿造均具有举足轻重的意义。

酿造环境与大曲都是酱香白酒酿造不可或缺的部分,环境和曲中的酵母通过堆积富集等途径进入发酵酒醅,对酒醅的发酵以及酒体风味形成发挥重要作用。但目前仍然鲜见对酿造环境区域及酿酒大曲中酵母的系统研究。为进一步探究环境微生物结构对白酒酿造品质的影响,本课题在前期利用宏基因组学系统分析微生物结构的基础上,通过可培养方法,对茅台镇酱香白酒7个

不同酿造区域1~7轮次酿造环境和大曲中的可培养酵母菌群结构进行一个年度生产期(1~7轮次)的跟踪分析研究,拟充分认识不同区域酿造环境和大曲之间酵母菌的多样性结构特征及其关系,解析大曲中酵母的来源,以期分析各区域白酒品质差别提供理论支持。

1 材料与amp;方法

1.1 材料与试剂

取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区域,17个代表性酿酒企业的酿造环境和生产应用大曲样品。环境取样点包括:酒厂生产车间的窗户玻璃表面、窗台上、晾堂四周墙体表面、晾堂地面、墙角、行车梯梯子及梁柱表面、配电箱表面、消防箱表面、储酒罐及其他一些平时不易被打扫的角落、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。每个企业样品采集的每次取样点固定为同一点。按照区域划分,将从每个酒厂采集的样品等量混合为一个区域的综合样(研究实验分析样品,代表一个区域的综合样品)。每轮次采集样品为2 d时间,采集样品均匀密封袋、专用箱转运,样品采集完立即生物性保藏回实验室研究分析,留存样低温保存。

DNA Marker 上海生物工程(上海)股份有限公司;真菌DNA提取试剂盒 北京索莱宝科技有限公司;核酸染料(Gengreen) 上海赛百盛有限公司;酵母引物(NL1和NL4) 北京全式金生物技术有限公司。

WL营养培养基:酵母粉5.0 g、酸水解酪蛋白5.0 g、葡萄糖50.0 g、磷酸二氢钾0.55 g、氯化钾0.425 g、氯化钙0.125 g、硫酸镁0.125 g、氯化铁0.002 5 g、硫酸锰0.002 5 g、溴甲酚绿0.022 g、琼脂17 g,溶于1 000 mL蒸馏水中,pH 5.5±0.2。麦芽汁液体培养基:麦芽膏粉130.0 g、氯霉素0.1 g,溶于1 000 mL蒸馏水中,pH 5.6±0.2。均购于上海博微生物科技有限公司。

1.2 仪器与设备

超净工作台 苏州金净科技有限公司;高压蒸汽灭菌锅台式、高速冷冻离心机 美国Thermo Fisher公司;旋涡混合器 海门市其林贝尔仪器制造有限公司;

HH-4数显恒温水浴锅 常州澳华仪器有限公司；PCR仪 美国伯乐公司；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。

1.3 方法

1.3.1 酵母菌株分离鉴定

分别称取各区域最后的综合样品25 g于装有225 mL 无菌生理盐水的三角瓶中，200 r/min振荡浸提30 min。吸取上清液，稀释到合适浓度，取100 μL涂布，3个平行；30 °C 倒置培养1~2 d。挑取不同形态的菌落至已灭菌的WL培养基，纯化培养直至得到单菌落，酵母菌的鉴定根据形态特征，可参照《常见与常用真菌》^[15]中的方法鉴定。

1.3.2 酵母菌基因组DNA提取

根据北京索莱宝科技有限公司的柱式真菌基因组DNA抽提试剂盒说明书，对酵母菌株进行基因组DNA提取，将提取的菌株基因组DNA置于-20 °C冰箱中保存备用。

1.3.3 26S rDNA的PCR扩增和产物检测

引物为NL1 (5'-GCATATCAATAAGCGGAGGAAA AG-3')、NL4 (5'-GGTCCGTGTTTCAAGACGG-3')。PCR体系 (25 μL)：primer 1和primer 2各1 μL，DNA模板2 μL，dd H₂O 8.5 μL，Mix 12.5 μL。PCR程序：94 °C 预变性5 min，94 °C变性30 s，55 °C退火45 s，72 °C延伸1 min，35个循环反应，最后72 °C继续延伸10 min^[16]。

1%琼脂糖凝胶检测扩增目标产物后，送生工生物工程 (上海) 股份有限公司测序。在NCBI的BLAST数据库中进行DNA序列比对分析，选取同源性较高的相关菌株的26Sr DNA D1/D2区域序列作为参比分析对象^[17]。

1.3.4 菌种保藏

甘油保藏：用接种环挑取纯化的菌株于5 mL于已灭菌麦芽汁液体培养基中，30 °C过夜培养，取0.5 mL培养的浑浊菌液和0.5 mL已灭菌的30%甘油于1.5 mL EP管中混合均匀，每个菌株做3个甘油保藏，标记并放置于-80 °C冰箱长期保藏。

1.4 数据处理

使用WPS进行数理统计分析，Origin 8.6对各区域环境的酵母种类、数量变化进行统计，采用在线软件绘制韦恩图 (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/Venn/>)。

2 结果与分析

2.1 不同区域酿造环境及大曲中可培养酵母菌种分析

从样品中共分离获得568株酵母，其中环境334株，大曲234株。环境与大曲酵母根据菌落形态及其颜色特征排重，共送检202株。通过酵母26S rDNA D1/D2区域序列比对分析，共鉴定得到15个属，36个种。其中，从环境样品中鉴定出26种酵母菌，大曲中鉴

定出21种酵母菌。表1为本课题分离鉴定与其他研究报道酵母菌的比较分析结果。

表1 本课题分离鉴定结果与其他文献报道酵母菌比较分析
Table 1 Comparative analysis between the strains of yeast identified in this study and those reported in the literature

本课题分离获酵母菌种	其他研究报道
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	胡峰等 ^[18]
<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	黄永光 ^[19] 、Wu Qun ^[20] 等
<i>Issatchenkia orientalis</i>	黄永光 ^[19] 、Wu Qun ^[20] 等
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	黄永光 ^[19] 、Wu Qun ^[20] 等
<i>Pichia galeiformis</i>	邵明凯等 ^[21]
<i>Trichosporon asahii</i>	邵明凯等 ^[21]
<i>Torulasporea delbrueckii</i>	邵明凯等 ^[21]
<i>Saccharomyces paradoxus</i>	卢君等 ^[22]
<i>Candida glabrata</i>	卢君等 ^[22]
<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	赵群丽 ^[23]
uncultured fungus	高亦豹 ^[10]
<i>Candida allociferrii</i>	高亦豹 ^[10]
<i>Cryptococcus neoformans</i>	郭敏等 ^[24]
<i>Hyphopichia burtonii</i>	王晓丹等 ^[25]
<i>Saccharomycopsis fibuligera</i>	王晓丹等 ^[25]
<i>Kazachstania barnettii</i>	刘雯雯 ^[26]
<i>Candida humilis</i>	王勇 ^[27]
<i>Pichia kudriavzevii</i>	白小燕 ^[28]
<i>Kodamaea ohmeri</i>	文淑婷等 ^[29]
<i>Pichia farinosa</i>	杨建刚等 ^[30]
<i>Hanseniaspora uvarum</i>	熊子书 ^[31]
<i>Pichia kluyveri</i>	熊子书 ^[31]
<i>Trichosporonoides</i> sp. SZ8Y3	陈美竹 ^[4]
<i>Cryptococcus albidus</i>	张秀红等 ^[32]
<i>Pichia pastoris</i>	Tang Jie等 ^[33]
<i>Nectaromyces rattus</i>	未见报道
<i>Wickerhamomyces</i> sp. H1Y23	未见报道
uncultured yeast	未见报道
<i>Issatchenkia</i> sp. S612Y5	未见报道
<i>Wickerhamomyces pijperi</i>	未见报道
<i>Trichosporon faecale</i>	未见报道
<i>Kazachstania</i> sp. IMB190R	未见报道
<i>Pseudozyma</i> sp.	未见报道
<i>Kazachstania solicola</i>	未见报道
<i>Torulasporea</i> sp. Z8Y10	未见报道
<i>Helicoceras oryzae</i>	未见报道

核苷酸序列比对结果 (表1) 表明，所分离获得的酵母包括复膜孢酵母属 (*Saccharomycopsis*)、裂殖酵母属 (*Schizosaccharomyces*)、红酵母属 (*Rhodotorula*)、有孢汉生酵母属 (*Hanseniaspora*)、柯达酵母属 (*Kodamaea*)、拜耳结合酵母属 (*Zygosaccharomyces*)、南极假丝酵母属 (*Pseudozyma* sp) 各1种，隐球菌属 (*Cryptococcus*)、德巴利酵母属 (*Torulasporea*)、酿酒酵母属 (*Saccharomyces*)、伊萨酵母属 (*Issatchenkia*) 各2种，丝孢酵母属 (*Trichosporon*) 3种，维克汉姆酵母属 (*Wickerhamomyces*) 4种，毕赤酵母属 (*Pichia/Hyphopichia*) 6种，假丝酵母属

(*Candida*) 8种, 4株未知属 *N. rattus*、*H. oryzae*、uncultured fungus、uncultured yeast。

Wu Qun等^[17]从酱香型白酒酿造过程中鉴定出9种酵母菌, 并且结果表明*S. cerevisiae*、*Z. bailii*、*P. membranifaciens*和*S. pombe*为堆积过程的优势酵母。本次实验从环境和大曲中未分离出*Z. bailii*、*P. membranifaciens*, 但本课题组其他人员从3、4、5轮次酒醅中分离出*Z. bailii*, 未分离出*P. membranifaciens*, 原因可能是*Z. bailii*、*P. membranifaciens*存在于不同轮次酒醅和环境中的差异, 且*P. membranifaciens*是好氧菌, 在酒醅中的数量一直很低。酿造环境和大曲中未发现*Z. bailii*、*P. membranifaciens*可能的原因是环境和大曲的条件不适合这两种酵母生存。通过与其他相关研究结果比较, 本课题检出酵母在属水平和种水平最为丰富, 并且在酱香白酒酿造过程中首次检出10种酵母, 分别为*N. rattus*、*Wickerhamomyces* sp. H1Y23、*T. faecale*、*Issatchenkia* sp. S612Y5、*W. pijperi*、*Kazachstania* sp. IMB190R、*Pseudozyma* sp.、*K. solicola*、*Torulaspota* sp. Z8Y10和*H. oryzae*; 同时也较为系统的对酱香白酒酿造环境区域和大曲的酵母资源进行深入解析, 进一步丰富了酱香型白酒酿造微生物资源信息库。

2.2 不同区域酿造环境酵母种群多样性结构

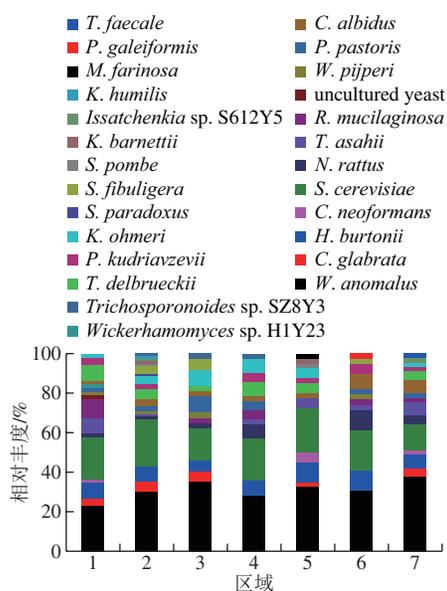


图1 各区域环境样品酵母种群结构变化

Fig. 1 Changes in yeast population structure in environmental samples from various brewing regions

从环境样品中分离获得334株酵母, 分属于14个属、26个种(包括1株*N. rattus*和uncultured yeast)。环境样品酵母多样性结构分布结果见图1。由不同酵母菌的检出频率可知, *W. anomalous*、*H. burtonii*、*S. cerevisiae*和*C. albidus*检出频率为100%; 其次为*N. rattus*、*T. asahii*、

P. pastoris、*T. delbrueckii*、*P. kudriavzevii*和*K. ohmeri*, 检出频率为85.71%, *C. glabrata*和*R. mucilaginoso*检出频率为71.43%, 其余酵母菌检出频率都低于43%。其中, uncultured yeast、*Wickerhamomyces* sp. H1Y23、*S. paradoxus*、*C. humilis*、*M. farinosa*、*P. galeiformis*和*T. faecale* 7个种的酵母菌只出现在1个区域且仅分离出1株, 具有明显的区域性微生态特征。26种酵母菌中, 相对丰度最大的为*W. anomalous* (30.24%), 其次为*S. cerevisiae* (20.36%) 和*H. burtonii* (7.78%), 相对丰度都超过了7%, 其余酵母菌株相对丰度小于4%。

黄永光等^[34]对茅台酒酿造发酵过程中的微生物酿造机理研究表明, 其发酵环境为极端酿造环境, 属于高温、高乙醇、高酸度的微生物生态环境。因此, 发酵过程的酵母来源值得进一步探索。大气空气环境中已知的细菌和放线菌有1200种, 真菌有4000种, 主要来自自然界的水、土壤、动物等^[35]。张文平^[36]认为酱香型白酒在酿造过程中很大一部分微生物来自空气。研究显示^[37-38], *Cryptococcus*、*Hanseniaspora*、*Pichia*、*Candida*、*Debaryomyces*、*Issatchenki*、*Rhodotorula*、*Kodamaea*和*Wickerhamomyces*等酵母属大量存在于淡水、土壤及生物内脏等, 且大部分为土壤优势菌属。本课题采集样品为茅台镇酿造酱香白酒的不同酿造环境, 主要包括酿造空气沉降灰尘、酿造车间地面灰尘、酿造区域土壤等, 所采集样品具有充分的代表性, 能体现环境样品特征性。结合环境酵母的检出频率和相对丰度, 结果表明茅台镇酱香白酒酿造环境的酵母菌结构的特征性优势种为*W. anomalous*、*S. cerevisiae*和*H. burtonii*。这些酵母在大曲和酒醅当中也有适量的存在, 由此可知, 环境样品中的酵母主要来自酿造环境的土壤、空气、水和动植物等, 这充分说明特殊酿造环境中的生物资源是白酒酿造过程中酵母菌的重要来源之一, 同时也表明酿造环境生态中的本底微生物结构对传统白酒酿造的重要性, 这就是国内外不同酒类酿造产区形成的产业基础和核心产区酿造微生物结构差异特征, 由此才有中国遵义(茅台)酱香白酒产区、泸州浓香产区、宜宾浓香产区的特色白酒产业分布结果等。

2.3 不同区域酿造企业生产用大曲酵母种群多样性特征

从大曲中分离出234株酵母, 经形态与分子鉴定其分属于12个属、21个种(包括1株*H. oryzae*和uncultured fungus), 结果如图2所示。*W. anomalous*、*S. cerevisiae*、*H. burtonii*和*S. fibuligera*检出频率为100%, 其次*C. allociferrii*、*I. orientalis*和*C. glabrata*检出频率为85.71%, 在6个区域生产的大曲中均出现; *P. kluyveri*检出频率为71.43%, 其余酵母出现区域少于4个区域, 且分离出的酵母数量较少。*W. anomalous* (95株)的相对丰度在每个轮次中的比

例都比较高,其次为*S. fibuligera* (23株)、*H. burtonii* (15株)、*S. cerevisiae* (14株),其余酵母都低于14株,其中*Trichosporonoides* sp. SZ8Y3、uncultured fungus、*R. mucilaginosa*、*S. paradoxus*和*Pseudozyma* sp.只出现在某一区域酿造生产的大曲中,且为1株。结合酵母菌在大曲中检出频率及相对丰度可知,茅台镇酱香白酒酿造区域生产大曲中特征性优势酵母为*W. anomalus*、*S. fibuligera*和*H. burtonii*。其次为*S. cerevisiae*、*I. orientalis*和*C. glabrata*。

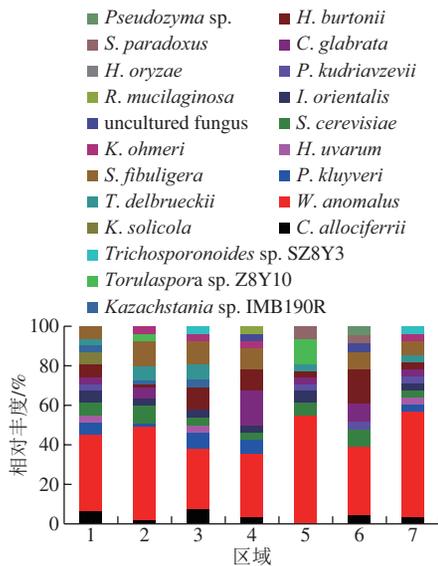


图2 各区域大曲样品中的酵母种群结构变化

Fig. 2 Changes in yeast population structure in *Daqu* from various brewing regions

郭敏^[39]通过高通量对传统大曲和机械大曲中的真菌进行分析比较,结果表明*Wickerhamomyces* (传统制曲为37.32%,机械制曲为4.91%)是其主要真菌属;Wang Haiyan等^[40]对多种大曲DGGE研究结果表明高温大曲中存在多种酵母,其中*P. anomala*和*S. fibuligera*在酱香大曲中处于优势地位;王晓丹等^[25]分离筛选酱香高温大曲中的酵母菌,在分离时出现大量*S. fibuligera*形态的酵母,且*S. fibuligera*、*I. orientalis*和*H. burtonii*在酱香型白酒高温大曲中均有报道;蒋思峡等^[16]从传统和机械大曲中都分离出*S. fibuligera*和*S. cerevisiae*;朱婷婷^[41]用传统分离方法分析牛栏山大曲真菌的多样性,得出*S. fibuligera*为大曲的优势菌;高亦豹^[10]对不同工艺生产大曲(如口子窖中温曲、剑南春中偏高温曲、郎酒高温曲等)酵母26S rRNA区基因DGGE图谱分析,发现*S. fibuligera*和*W. anomalus*普遍存在于这些大曲中;王勇^[27]运用高通量测序对牛栏山大曲的微生物菌群结构进行研究,得出*S. fibuligera*是主体真核微生物;乔晓梅等^[42]研究得出*P. kudriavzevii*和*S. fibuligera*是清香型大曲

中的优势菌;胡佳音等^[43]对清、酱、浓3种大曲真菌进行多样性分析,结果表明*S. fibuligera*是清香大曲的主要真菌,*P. kudriavzevii*是浓香大曲主要真菌,*Eurotium chevalieri*和*Thermomyces lanuginosus*是酱香型大曲的主要真菌。结合其他研究者的研究结论以及本课题研究结果,说明*W. anomalus*、*S. fibuligera*、*P. kudriavzevii*、*I. orientalis*和*H. burtonii*为一般传统大曲中的优势酵母;*W. anomalus*和*S. fibuligera*为酱香大曲的特征性优势酵母,本研究明确了酱香大曲的优势酵母菌,为大曲微生物系统研究提供理论支持。通过与环境检出酵母相比较分析,大曲与环境中的特征优势酵母菌的检出频率及相对丰度具有一致性,进一步说明茅台镇酿造核心区域环境酵母种群结构对酱香白酒酿造质量调控的重要意义。

2.4 不同区域酿造环境与大曲酵母种群结构多样性差异

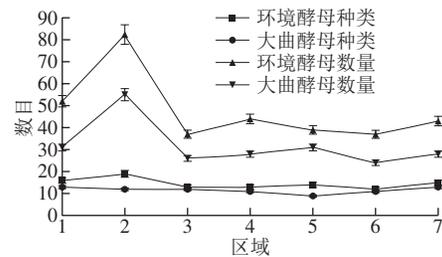


图3 各酿造区域环境、大曲中酵母数量及种类变化

Fig. 3 Changes in the number and type of yeast strains in environmental samples and *Daqu* from each brewing area

由图3可知,环境和大曲中的可培养酵母数量和酵母种类在各区域的变化上具有基本一致性趋势。在酵母数量上都呈现先急剧上升后急剧下降,最后趋于平缓的变化规律。其中,2区域酵母数量和种类最多,其原因可能是2区域的条件更适合大多数酵母的生存或该区域的酿酒微生物生态驯化程度很高,使得酵母数量和种类增加,这为酱香白酒企业的选址提供一定的基础理论。这与吴徐建^[12]的报道结论具有相似性,其认为空气中存在的酵母种属与大曲中的酵母种属基本一致。各酿造区域环境的酵母种群数量普遍高于大曲,其中2区域环境酵母数量几乎是daqu中酵母数量的2倍,其他各区域的数量变化也遵循此趋势,其主要原因源于高温制曲工艺对酵母的筛选和酿造区域生产环境对酵母的富集和驯化,其进一步说明环境微生物驯化及其资源的重要性。从酵母种类来看,环境中的酵母种类数高于大曲,但是差异相差不大。总体而言,环境中的酵母数量和种类都高于大曲,两者在酵母数量上具有明显差异,但酵母种类差异不大。结合张亚丽^[14]、吴徐建^[12]和范光先等^[13]的研究结论以及本课题研究结论,说明酿造环境对酱香白酒大曲中酵母的来源具有重要贡献和调控功能。

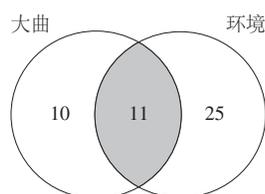


图4 大曲及环境中酵母种群的Venn分析图

Fig. 4 Venn analysis of yeast populations in *Daqu* and environmental samples

利用Venn图可直观反映酿造环境与大曲在可培养酵母种群结构多样性方面的共有特征及特有种群的特征性。图4结果表明,大曲在酵母种群上高达52.38%来自环境。环境与大曲相同的酵母菌为*S. cerevisiae*、*W. anomalus*、*H. burtonii*、*C. glabrata*、*Trichosporonoides* sp. SZ8Y3、*S. paradoxus*、*R. mucilaginosa*、*S. fibuligera*、*T. delbrueckii*、*P. kudriavzevii*和*K. ohmer*。酱香型白酒酿造生产应用的高温大曲需要存放一段时间才能使用,前期的高温使酵母很少存活或处于休眠状态,由于环境中的酵母种类多样性高于大曲,而大曲在贮存过程可富集环境中的酵母,既实现环境中有益酵母向大曲的迁移,又实现了酵母种类数量的富集,使大曲中酵母的多样性得到增加,为后续的发醇生产提供发酵动力。

3 结论

对茅台镇酱香白酒酿造的7个不同酿造区域环境及生产大曲的可培养酵母种群结构多样性进行研究,获得了568株酵母菌,先后经形态和26S rRNA D1/D2区序列鉴定,对202株进行鉴定,最后鉴定为36种不同酵母。通过对酿造环境及大曲中酵母的多样性进行分析,得出酿造环境的特征性优势酵母为*W. anomalus*、*S. cerevisiae*和*H. burtonii*;酱香大曲的特征性优势酵母为*W. anomalus*和*S. fibuliquaras*,明确了酱香大曲的优势酵母菌结构。且环境中的酵母和大曲中的酵母在检出频率及相对丰度上具有一致性,进一步说明环境是白酒酿造过程中重要的微生物来源。

环境中的酵母数量和酵母种类高于大曲,其中2区域环境和的大曲的酵母数量和种类都高于其他区域,进一步又证实了环境是酱香型白酒酿造微生物的主要来源,为茅台镇酱香白酒生产厂地选址奠定了理论基础,同时也说明了同一酿造大区域内部不同的微生物生态结构差异性特征。与现有文献报道比较,本课题研究所获得的*N. rattus*、*Wickerhamomyces* sp. H1Y23、*Issatchenkia* sp. S612Y5、*W. pijperi*、*T. faecale*、*Kazachstania* sp. IMB190R、*Pseudozyma* sp.、*K. solicola*、*Torulaspora* sp. Z8Y10和*H. oryzae*为首次在酱香型白酒酿造过程检出的酵母,其在酱香型白酒酿造过程的功能正在开展进一步的详细研究和功能证实。

参考文献:

- [1] 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.
- [2] 张建敏. 酱香白酒酿造过程放线菌的筛选与风味研究[D]. 贵阳: 贵州大学, 2015.
- [3] WANG Q, ZHANG H X, LIU X. Microbial community composition associated with Maotai liquor fermentation[J]. Journal of Food Science, 2016, 81(6): 1485-1494. DOI:10.1111/1750-3841.13319.
- [4] 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.
- [5] 王伟,俞志敏,侯英敏,等. 产香酵母*Pichia myanmarensis* LX15的分离纯化及对精酿啤酒风味物质形成的影响[J]. 微生物学杂志, 2018, 38(4): 34-40.
- [6] 陈梦圆,刘学彬,汪平,等. 产酯香功能菌对酱香型酒醅的影响[J]. 食品科学, 2018, 39(10): 199-205. DOI:10.7506/spkx1002-6630-201810031.
- [7] 王俏. 白酒大曲贮存过程中主要微生物活性快速检测方法的研究[D]. 乌鲁木齐: 新疆农业大学, 2015.
- [8] 王晓丹,徐佳,周鸿翔,等. 酱香型大曲中分离到的阿姆斯特丹散囊菌产酶产香特性[J]. 食品科学, 2016, 37(11): 154-159. DOI:10.7506/spkx1002-6630-201611027.
- [9] 蒋红军. 茅台酒制曲发酵过程中微生物演替及作用规律[J]. 酿酒科技, 2004(3): 39-40. DOI:10.3969/j.issn.1001-9286.2004.03.009.
- [10] 高亦豹. PCR-DGGE研究中国白酒大曲中微生物群落结构[D]. 无锡: 江南大学, 2010.
- [11] 胡晓龙. 浓香型白酒窖泥中梭菌群落多样性与窖泥质量关联性研究[D]. 无锡: 江南大学, 2015.
- [12] 吴徐建. 酱香型白酒固态发酵过程中酵母与细菌群落结构变化规律的研究[D]. 无锡: 江南大学, 2013.
- [13] 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.
- [14] 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.
- [15] 中国科学院. 常见与常用真菌[M]. 北京: 科学出版社, 1978: 77-250.
- [16] 蒋思映,邱树毅,邹江鹏,等. 传统酱香大曲与机械化酱香大曲中酵母菌的初步研究[J]. 中国酿造, 2017, 36(3): 59-65. DOI:10.11882/j.issn.0254-5071.2017.03.013.
- [17] WU Q, XU Y, CHEN L. Diversity of yeast species during fermentative process contributing to Chinese Maotai-flavour liquor making[J]. Letters of Applied Microbiology, 2012, 55(4): 301-307. DOI:10.1111/j.1472-765X.2012.03294.x.
- [18] 胡峰,钟方达,黄永光,等. 酱香型白酒窖内不同层次酒醅微生物与酒体风格的研究[J]. 酿酒科技, 2014(9): 48-52. DOI:10.13746/j.njkj.2014.0211.
- [19] 黄永光,谌永前,吴广黔,等. 酱香白酒堆积发酵过程酒醅中酵母菌的分析研究[J]. 酿酒科技, 2013(6): 8-13. DOI:10.13746/j.njkj.2013.06.008.
- [20] WU Q, CHEN L Q, YAN X. Yeast community associated with the solid state fermentation of traditional Chinese Maotai-flavor liquor[J]. International Journal of Food Microbiology, 2013, 166(2): 323-330. DOI:10.1016/j.ijfoodmicro.2013.07.003.
- [21] 邵明凯,王海燕,徐岩,等. 酱香型白酒发酵中酵母群落结构及其对风味组分的影响[J]. 微生物学通报, 2014, 41(12): 2466-2473. DOI:10.13344/j.microbiol.china.140210.
- [22] 卢君,山其木格,李长文,等. 酱香型白酒酵母菌群快速鉴定及发酵性能初探[J]. 中国酿造, 2017, 36(10): 82-86. DOI:10.11882/j.issn.0254-5071.2017.10.018.

- [23] 赵群丽. 酱香大曲中酿酒微生物的筛选及发酵工艺研究[D]. 贵州大学, 2016.
- [24] 郭敏, 黄永光, 邱树毅, 等. 高通量测序在酱香白酒微生态多样性研究中的应用[J]. 中国酿造, 2017, 36(5): 146-151. DOI:10.11882/j.issn.0254-5071.2017.05.031.
- [25] 王晓丹, 陈美竹, 邱树毅, 等. 茅台大曲中酵母的分离、鉴定及其功能初探[J]. 食品科学, 2017, 38(4): 51-57. DOI:10.7506/spkx1002-6630-201704009.
- [26] 刘雯雯. 酱香型白酒酒醅中真菌资源与多样性的研究[D]. 齐齐哈尔大学, 2012.
- [27] 王勇. 牛栏山二锅头酵母菌多样性研究及其代谢产物分析[J]. 中国酿造, 2019, 38(3): 28-34. DOI:10.11882/j.issn.0254-5071.2019.03.007.
- [28] 白小燕. 酱香白酒酿造过程产多元醇酵母菌株筛选及应用研究[D]. 贵阳: 贵州大学, 2017.
- [29] 文淑婷, 李艳. 老白干酒曲中酵母菌多样性分析[J]. 食品科学, 2018, 39(24): 175-182. DOI:10.7506/spkx1002-6630-201824027.
- [30] 杨建刚, 苏畅, 窦晓, 等. 泸型酒发酵过程中酵母菌演替规律及其对部分风味分子形成的影响[J]. 食品科学, 2018, 39(18): 166-172. DOI:10.7506/spkx1002-6630-201818026.
- [31] 熊子书. 中国酿酒酵母菌的研究: 不同酒类酵母筛选与应用纪实(上)[J]. 酿酒科技, 2002(4): 23-27. DOI:10.13746/j.njkj.2002.04.003.
- [32] 张秀红, 张武斌, 段江燕. 宏蛋白质组学方法对清香大曲蛋白分析[J]. 食品科技, 2015, 40(9): 258-264. DOI:10.13684/j.cnki.spkj.2015.09.055.
- [33] TANG J, WANG H Y, XU Y. Effect of mixed culture of *Saccharomyces cerevisiae* and *Pichia anomala* on fermentation efficiency and flavor compounds in Chinese liquor[J]. Microbiology China, 2012, 39(7): 921-930. DOI:10.13344/j.microbiol.china.2012.07.003.
- [34] 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.
- [35] 方治国, 欧阳志云, 胡利锋, 等. 北京市夏季空气微生物群落结构和生态分布[J]. 生态学报, 2005(1): 83-88.
- [36] 张文平. 国酒茅台的可持续发展与环境保护[J]. 酿酒科技, 2006(4): 109-110; 114. DOI:10.13746/j.njkj.2006.04.041.
- [37] 蔡燕丽. 新疆桃园酵母菌多样性研究及其资源评估[D]. 石河子: 石河子大学, 2018.
- [38] 王琦琦, 张瑶, 雷勇辉, 等. 石河子不同树龄蟠桃土壤中可培养酵母多样性分析及功能酵母的筛选[J]. 生物资源, 2019, 41(1): 44-52. DOI:10.14188/j.ajsh.2019.01.007.
- [39] 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.
- [40] WANG H Y, GAO Y B, FAN Q W, et al. Characterization and comparison of microbial community of different typical Chinese liquor *Daqu* by PCR-DGGE[J]. Letters in Applied Microbiology, 2011, 53(2): 134-140. DOI:10.1111/j.1472-765X.2011.03076.x.
- [41] 朱婷婷. 牛栏山大曲可培养微生物多样性分析[J]. 酿酒科技, 2018(5): 75-79. DOI:10.13746/j.njkj.2018024.
- [42] 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. DOI:10.13746/j.njkj.2015076.
- [43] 胡佳音, 周森, 赵卫鹏, 等. 清、浓、酱三种大曲真菌多样性初步分析[J]. 酿酒科技, 2016(8): 87-90. DOI:10.13746/j.njkj.2016121.