

酱香型白酒高温大曲发酵过程中真菌多样性研究

吴成, 程平言, 谢丹, 黄魏, 李岭卓, 张健, 尤小龙, 胡峰, 钟方达*

(贵州茅台酒厂(集团)习酒有限责任公司, 贵州 习水 564622)

摘要: 基于传统可培养方法和单分子实时测序技术对酱香型白酒仿生机曲和传统人工曲发酵过程的真菌群落组成及特征进行了研究。结果表明, *Wickerhamomyces anomalus*、*Pichia kudriavzevii*、*Candida tropicalis*、*Kodamaea ohmeri*、*Kazachstania humilis*、*Kluveromyces marxianus* 和 *Aspergillus* 属丝状真菌, 可以同时被 2 种方法检出, 从曲坯成型入仓到发酵结束出仓, 真菌多样性呈现逐渐降低的趋势。同时, 与二代高通量测序结果相比, 单分子实时测序技术在种水平上更适用于小类真菌多样性的鉴定。此外, 高温大曲多数优势真菌属之间呈显著正相关调节机制, 其中包括 55 个真菌属呈显著正相关, 6 个真菌属呈显著负相关。本研究揭示了酱香型白酒高温大曲制作过程的真菌群落组成及其特征, 旨在为挖掘高温大曲中功能微生物及阐明高温大曲发酵机理提供依据。

关键词: 高温大曲; 单分子实时测序; 可培养方法; 物种相关性分析

中图分类号: TS 261.1 文章编号: 1673-1689(2023)06-0095-09 DOI: 10.3969/j.issn. 1673-1689.2023.06.012

Investigation on Fungal Diversity During High-Temperature *Daqu* Fermentation of Sauce-Flavor Baijiu

WU Cheng, CHENG Pingyan, XIE Dan, HUANG Wei, LI Lingzhuo,

ZHANG Jian, YOU Xiaolong, HU Feng, ZHONG Fangda*

(Guizhou Maotai Distillery (Group) Xijiu Co., Ltd., Xishui 564622, China)

Abstract: Traditional culture-dependent approaches and single molecule real-time sequencing technology were applied to investigate the fungal community composition and characteristics during the fermentation process of sauce-flavor baijiu using the biomimetic machine-produced *Daqu* and the traditional manual *Daqu*. The results showed that *Wickerhamomyces anomalus*, *Pichia kudriavzevii*, *Candida tropicalis*, *Kodamaea ohmeri*, *Kazachstania humilis*, *Kluveromyces marxianus*, and *Aspergillus* could be simultaneously detected by both approaches. The fungal diversity gradually decreased from the formation of *Daqu* to the end of fermentation. In addition, compared with the results of second-generation high-throughput sequencing, single-molecule real-time sequencing technology was more suitable to identify the diversity of minor fungal. Moreover, the dominant fungal genera the high-temperature *Daqu* showed a significant positive correlation regulation mechanism, including 55 fungal genera showing a significant positive correlation, and 6 fungal

收稿日期: 2021-09-02

基金项目: 遵义市优秀青年科技创新人才培养项目(遵优青[2019]1号); 贵州省科技计划项目(黔科合成果[2020]2Y042)。

* 通信作者: 钟方达(1965—), 男, 硕士, 工程技术应用研究员, 主要从事白酒酿造技术创新管理及工艺改进研究。

E-mail: 1165838987@qq.com

genera showing a significant negative correlation. This study revealed fungal community composition and characteristics during high-temperature *Daqu* fermentation of sauce-flavor baijiu, and aimed to lay a theoretical foundation for exploiting functional microorganisms and clarifying the fermentation mechanism of high-temperature *Daqu*.

Keywords: high-temperature *Daqu*, single molecule real-time sequencing, culture-dependent approaches, correlation network analysis

中国白酒种类丰富、风味独特。酱香型白酒以贵州茅台、贵州习酒、四川郎酒为代表,具有酱香突出、幽雅细腻的特征,该特点的形成与高温大曲密切相关^[1]。高温大曲是以小麦为原料,加入水和母曲,在发酵过程中品温最高可达 60~70 °C 的一种糖化剂和发酵剂,具有提供菌源、糖化发酵、产酒生香的作用^[2]。其中富含功能丰富的真菌微生物,如酵母菌 *Saccharomyces* 和 *Pichia* 可以产生多种风味物质;丝状真菌如 *Aspergillus*、*Rhizomucor* 和 *Rhizopus* 可以代谢多种酶类包括 α -淀粉酶、葡糖淀粉酶等^[3-6],因此,解析高温大曲中真菌群落组成对挖掘功能微生物具有重要意义。

传统的酱香型白酒高温大曲制作主要是通过人工踩制,存在劳动强度大、生产效率低、人工成本高的缺点^[7-8]。目前,现代生物技术、自动化和电子技术已应用于白酒生产中,以改进传统白酒生产工艺、提高白酒质量和风味,进而推进机械化在高温大曲制作中的应用^[9-10]。高温大曲机械化压制过程与人工踩制过程类似,其采用独创气缸模拟人工脚掌踩曲,降低了劳动强度、提高了生产效率^[8]。近年来,随着分子生物技术的发展,高通量测序技术由于具有测序方法简单、通量高、速度快和准确性较高的特点,被广泛应用于酿造微生物多样性研究中^[11]。相关研究者将高通量测序技术与传统可培养方法结合解析了高温大曲中真菌群落组成,结果表明在高温大曲中优势真菌主要包括 *Candida*、*Trichoderma*、*Aspergillus* 和 *Thermomyces*,但在不同产区、不同发酵时期以及小类真菌群落组成上表现出差异性^[12-18],并且其中还存在一定数量的未知菌属有待于进一步分析鉴定。随着高通量测序技术的发展,以 PacBio(Pacific BioSciences)公司的单分子实时测序技术(Single molecule real-time sequencing, SMRT)为代表的三代高通量测序技术已开始应用于酿酒微生物多样性的研究中^[19]。与二代高通量测序技术相比,SMRT 测序技术具有读取序

列长度长、精确度高的优点,可以将更多的微生物注释到种水平^[11,20-21]。但由于 SMRT 测序技术成本相对较高,目前较少见到其在高温大曲微生物多样性中应用的研究报道。

因此,为解析酱香型白酒仿生机制曲及传统人工曲发酵过程真菌多样性及特征,以及比较 SMRT 测序技术与二代高通量测序技术分析结果异同,作者采用传统可培养方法及 SMRT 测序技术对酱香型白酒高温大曲发酵过程,包括曲坯成型入仓(发酵 0 d)、一次翻曲(发酵 8 d)、二次翻曲(发酵 15 d)、曲坯出仓(发酵 35 d)中真菌多样性及特征进行研究,旨在解析酱香型白酒高温大曲制作过程中真菌群落组成及其特征,为挖掘高温大曲中功能微生物及进一步阐明高温大曲发酵和调控机理提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

高温大曲:采集于贵州茅台酒厂(集团)习酒有限责任公司;Power DNA Isolation Kit 试剂盒:美国 Mibio 公司产品;孟加拉红培养基、PDA 培养基:北京奥博星生物技术有限公司产品;WL 培养基:上海博微生物科技有限公司产品;YPD 培养基:2 g/dL 葡萄糖、2 g/dL 蛋白胨、1 g/dL 酵母浸粉,固体 YPD 培养基中加入 2 g/dL 琼脂。

1.2 仪器与设备

SW-CJ-2F 无菌操作台:苏州净化设备有限公司产品;ZQPW-70 全温振荡培养箱:天津市莱玻特瑞仪器设备有限公司产品;YXQ-LS-100SII 立式压力蒸汽灭菌器:上海博迅实业有限公司产品;DM500 光学显微镜:德国 LEICA 公司产品;PCR 仪:美国 ThermoFisher 公司产品;PacBio Sequel 测序平台:美国 PacBio 公司产品。

1.3 研究方法

1.3.1 样品处理 曲坯成型入仓(AQ)、一次翻曲

(YF)、二次翻曲(EF)和发酵结束出仓(CQ)各工艺环节按曲仓的门、中、窗不同位置各随机取3块高温大曲,于4℃下立即带回实验室粉碎,按1:1:1比例混合为一个综合样品,共8个样品,其中仿生机制曲4个、传统人工曲4个;样品编号分别为AQ1、YF1、EF1、CQ1、AQ2、YF2、EF2和CQ2(1表示仿生机制曲,2表示传统人工曲)。

1.3.2 实验方法

1) 真菌的分离及初鉴定 称取10 g大曲综合样品于90 mL无菌水中,30℃、180 r/min恒温振荡30 min,采用稀释涂布平板法(稀释度为 10^{-1} 、 10^{-2} 、 10^{-3})于孟加拉红培养基上分离筛选丝状真菌、WL培养基上分离筛选酵母菌,放置于30℃培养箱中分别培养2~3 d及5 d后,记录菌落总数。根据菌落形态随机挑取丝状真菌菌落3~5株、酵母菌30~50株,再次纯化于孟加拉红培养基和WL培养基上进一步观察菌落形态特征,同时结合光学显微镜下细胞形态对分离菌株进行初步鉴定^[22];丝状真菌纯化于PDA培养基,于4℃斜面保藏、酵母菌纯化于YPD液体培养基中,-80℃甘油保藏(40%甘油与菌液体积比为1:1)。

2) 菌株的分子鉴定 选取代表性菌株1~3株采用Ezup柱式真菌基因组DNA抽提试剂盒提取DNA,采用通用引物ITS1(TCCGTAGGTGAACCTGCGG)和ITS2(GCTGCGTTCTTCATCGATGC)PCR扩增后进行ITS鉴定。PCR反应体系包括:引物各1 μL;DNA模板2 μL;去离子水7 μL;PCR反应条件为:94℃预变性4 min;94℃变性20 s,55℃退火20 s,72℃延伸1 min,30次循环;72℃终延伸10 min,降至4℃。将PCR产物送至上海生工生物工程股份有限公司测序,采用BLAST软件与标准菌株序列进行比对分析,将相似度在97%以上的认定为同一菌种。

3) 单分子实时测序 样品总DNA采用PowerSoil DNA Isolation Kit试剂盒进行提取,具体操作步骤参照试剂盒说明书,选择ITS全长序列由北京擎科生物科技有限公司进行单分子实时测序。

1.3.3 数据处理 单分子实时测序中,由于测序片段的大小远远小于测序长度,因此目标片段会重复测多次(passes),通常当passes数目大于4时,环形一致性序列(Circular Consensus Sequencing, CCS)的准确性就可达99%以上。因此,测序完成后,通过

SMRT Link软件将原始下机数据校正得到CCS序列数据,按照最小passes ≥ 5 、最低预测准确率 ≥ 0.9 识别CCS序列。然后对CCS序列进行Barcode识别、过滤、去除嵌合体后,得到有效CCS序列,使用Usearch软件对有效CCS序列在97.0%相似度水平下进行聚类,获得OTU。以UNITE为参考数据库进行物种注释,使用QIIME2软件计算Chao1、Shannon和Simpson指数分析样品Alpha多样性;基于物种相对丰度使用SPSS软件进行主成分分析;使用CYTOSCAPE软件对真菌物种间相关性进行分析。

2 结果与分析

2.1 传统可培养方法

采用稀释平板涂布法,共分离保藏528株酵母菌、44株丝状真菌,结合其菌落及细胞形态特征,可将528株酵母菌划分为11种类型(I~XI)、丝状真菌4种类型(XII~XV),见图1。对代表性菌株进行ITS区域序列分析后,将其鉴定为*Saccharomyces cerevisiae*、*Wickerhamomyces anomalus*、*Pichia kudriavzevii*、*Millerozyma farinose*、*Candida tropicalis*、*Trichomonascus ciferrii*、*Kazachstania humilis*、*Clavispora lusitaniae*、*Torulaspora delbrueckii*、*Kodamaea ohmeri*、*Kluveromyces marxianus* 11种酵母菌,以及*Aspergillus fumigatus*、*Aspergillus nidulans*、*Aspergillus chevalieri*、*Rhizomucor pusillus* 4种丝状真菌。由表1可知,在AQ环节,仿生机制曲中酵母菌群落较传统人工曲丰富;YF至CQ环节,酵母菌数量逐渐降低;EF和CQ环节绝大部分已检测不出,这可能与发酵温度逐渐升高(YF环节温度达65℃左右)大部分酵母菌不耐高温有关。但也有少部分酵母菌如*M. farinosa*和*C. lusitaniae*表现出耐高温的特性。Jung等从韩国传统发酵剂Nuruk中筛选到了一株产木糖醇的耐热*M. farinose*^[23],Fan等从大曲中分离筛选到一株高产己酸乙酯的*C. lusitaniae*^[24],表明在高温大曲发酵过程中,耐高温酵母菌可能对大曲风味有重要贡献作用;而丝状真菌在高温大曲发酵整个过程都有检出,方程等研究表明,大曲中富含种类丰富的丝状真菌,除了具有分泌多种功能酶类、降解原料中淀粉和蛋白质、产生风味物质作用外,还具有强大的次级代谢产物合成潜力,是挖掘新天然产物的重要来源^[25]。

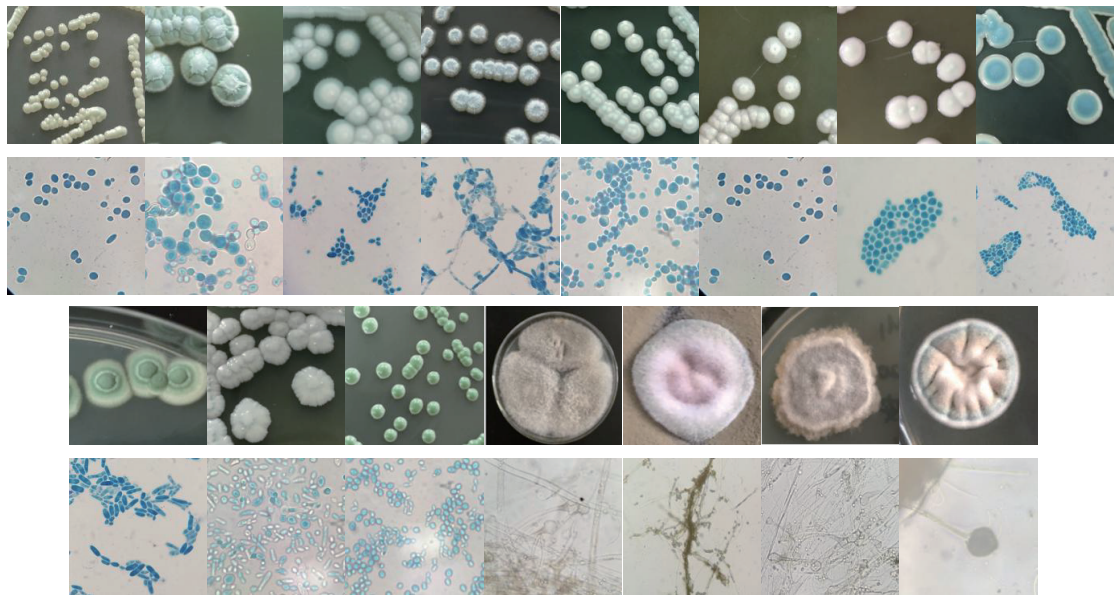


图 1 酱香型白酒高温大曲中真菌菌落及显微特征

Fig. 1 colonies and microscopic characteristics of fungal in high-temperature *Daqu* of sauce-flavor baijiu

表 1 依赖于可培养方法高温大曲中真菌群落变化情况

Table 1 change of fungal community in high temperature *Daqu* revealed by cultured-dependent approaches

种名	菌落 编号	标准菌株 编号	相似 度/%	数量/(CFU/g)							
				AQ1	YF1	EF1	CQ1	AQ2	YF2	EF2	CQ2
<i>S. cerevisiae</i>	I	CBS4903	99.40	(1.79± 0.23)×10 ³	—	—	—	(2.11± 0.05)×10 ⁴	—	—	—
<i>W. anomalus</i>	II	CBS5759	99.52	(6.78± 0.86)×10 ³	—	—	—	—	—	—	—
<i>P. kudriavzevii</i>	III	CBS8294	100	(2.50± 0.32)×10 ³	—	—	—	—	—	—	—
<i>M. farinosa</i>	IV	CBS2004	99.70	(1.79± 0.23)×10 ³	—	—	—	—	—	(4.16± 1.01)×10 ⁴	—
<i>C. tropicalis</i>	V	CBS1920	100	(2.14± 0.27)×10 ³	—	—	—	—	—	—	—
<i>T. ciferrui</i>	VI	CBS5646	99.81	—	(2.75± 0.60)×10 ³	—	—	—	(6.93± 0.64)×10 ⁴	—	—
<i>K. humilis</i>	VII	CBS8195	98.46	(1.07± 0.14)×10 ³	—	—	—	—	(4.62± 0.42)×10 ⁴	—	—
<i>C. lusitaniae</i>	VIII	CBS5094	99.23	(2.17± 0.64)×10 ³	—	—	—	(1.06± 0.02)×10 ⁴	—	—	(1.50± 0.50)×10 ⁴
<i>T. delbrueckii</i>	IX	CBS1146	99.25	(3.93± 0.50)×10 ³	—	—	—	(1.13± 0.25)×10 ⁵	(4.62± 0.42)×10 ⁴	—	—
<i>K. ohmeri</i>	X	CBS2038	100	(3.57± 0.46)×10 ²	(2.75± 0.60)×10 ³	—	—	(1.06± 0.02)×10 ⁴	—	—	—
<i>K. marxianus</i>	XI	CBS1554	100	(6.43± 0.82)×10 ³	—	—	—	(2.11± 0.05)×10 ⁴	—	—	—
<i>A. fumigatus</i>	XII	CBS457.75	100	—	(7.25± 0.12)×10 ²	(1.05± 0.15)×10 ⁴	(2.03± 0.25)×10 ⁵	—	(4.30± 0.50)×10 ²	1.03± 0.12×10 ⁵	(1.03± 0.08)×10 ²
<i>A. nidulans</i>	XIII	CBS114.63	99.47	—	—	—	—	—	(3.30± 0.30)×10 ²	—	—
<i>R. pusillus</i>	XIV	CBS425.78	99.83	(1.50± 0.50)×10 ²	—	—	—	—	—	—	—
<i>A. chevalieri</i>	XV	CBS414.67	99.82	—	—	—	—	—	(4.30± 0.50)×10 ²	—	—

2.2 单分子实时测序

2.2.1 测序数据质量及 Alpha 多样性指数分析 各样品采用 PacBio Sequel 测序后,对序列进行识别、过滤、去除嵌合体后共获得 58 410 条有效 CCS 序列,每个样品至少有 7 046 条有效序列,样品平均序列长度为 554~596 bp,见表 2。使用 QIIME2 软件分析各样品 Alpha 多样性指数,Chao1 指数可以反映样品中物种数量,Shannon 和 Simpson 指数可以反映样品中物种多样性。从 AQ 到 CQ 环节,仿生机制曲和传统人工曲的真菌多样性呈逐渐降低趋势。对

于仿生机制曲而言,Chao1 指数逐渐下降,Shannon 和 Simpson 指数在 AQ 和 EF 环节较高,在 YF 和 CQ 较低;而在传统人工曲中,Chao1、Shannon 和 Simpson 指数在 YF 和 CQ 环节较高,在 AQ 和 EF 环节较低,表明真菌群落组成在 2 种高温大曲中存在较大差异。同时,各样品中的覆盖率(Coverage)在 96.99%~99.97%,表明测序深度足够、各样品测序量充分,测序结果能够真实反映各样品中真菌群落结构和多样性。

表 2 样品测序及 Alpha 多样性指数结果

Table 2 Results of sample sequencing and Alpha-diversity indexes

样品编号	原始 CCS 数/条	识别并去除引物后的 CCS 数/条	长度过滤且去除嵌合体的有效 CCS 数/条	样品平均序列长度/bp	覆盖率/%	检测物种数量/个	Chao1	Shannon	Simpson
AQ1	7 494	7 421	7 397	592	99.97	107	110.33	3.68	0.82
YF1	7 494	7 397	7 371	561	99.75	42	62.00	1.82	0.54
EF1	7 513	7 398	7 361	554	96.99	26	40.20	3.06	0.82
CQ1	7 483	7 252	7 046	594	99.93	10	16.00	1.51	0.59
AQ2	7 439	7 475	7 349	550	99.92	72	75.50	2.78	0.70
YF2	7 547	7 463	7 437	594	99.95	87	95.43	3.07	0.74
EF2	7 424	7 282	7 240	596	99.91	11	20.50	0.43	0.12
CQ2	7 559	7 373	7 209	589	99.81	19	28.00	1.37	0.53

2.2.2 真菌多样性分析 使用 Usearch 软件对有效 CCS 序列在 97.0%相似度水平下进行聚类,共得到 178 个操作分类单元(Operational Taxonomic Units, OTU),进一步采用 UNITE 数据库对每个 OTU 进行注释比对,最终检测到 6 个门、17 个纲、32 个目、64 个科、114 个属和 162 个种。

在种水平上,将相对丰度在 1%以上的真菌认定为优势菌种,共检出包括 *Thermoascus aurantiacus*, *Thermoascus crustaceus*, *Byssoschlamys spectabilis*, *Thermomyces lanuginosus*, *P. kudriavzevii*, *K. humilis*, *W. anomalus*, *Geotrichum silvicola*, *C. tropicalis* 和 *A. subflavus* 等 24 个优势菌种,总的相对丰度在 88.74%以上,部分菌种与传统可培养方法鉴定分析结果一致,见图 2。在 AQ 环节,酵母菌如 *P. kudriavzevii* (10.34%/49.10%), *K. humilis* (33.64%/21.64%), *W. anomalus* (20.61%/9.81%) 和 *C. tropicalis* (7.09%/1.59%) 为主要优势菌种;随着发酵温度升高,酵母菌数量及种类逐渐下降,至 YF 环节, *T. aurantiacus* (65.48%/39.53%) 成为主要优势菌

种;到 EF 环节,仿生机制曲中真菌群落组成较传统人工曲丰富,EF1 与 EF2 相比,除 *T. aurantiacus* 和 *B. spectabilis* 外,还检出了一定量的 *T. crustaceus*、*W. anomalus* 和 *A. subflavus*,各相对丰度在 10.00%以上,同时还检出了少量的 *Hyphopichia burtonii*、*Wallemia canadensis* 和 *A. versicolor* 等;在 CQ 环节,以 *T. aurantiacus* (27.64%/6.31%)、*T. crustaceus* (55.77%/61.03%)、*B. spectabilis* (1.15%/2.11%)、*T. lanuginosus* (1.50%/30.12%) 为主的耐高温丝状真菌成为优势菌种。

在酱香高温大曲发酵过程中,在 AQ 环节 2 种高温大曲中以酵母菌为主要优势菌种,其可能是来源于母曲和周围环境^[20];随着发酵温度的升高(YF 至 EF 环节),由于大多数真菌不能在高温下存活,耐热丝状真菌及少部分耐热酵母菌成为主要优势菌种。有研究表明,在酱香型白酒高温大曲发酵过程中,大多真菌类微生物易受高温环境的调控^[14];到 CQ 环节,2 种大曲中真菌群落组成类似但在相对丰度上存在差异,可能与曲坯发酵结束后仿生机制曲

和传统人工曲水分和酸度存在差异有关^[27]。同时,与二代高通量测序结果相比,贵州茅台高温大曲中主要优势菌属包括 *Aspergillus*, *Mucor*, *Rhizopus*, *Candida*, *Pichia* 和 *Saccharomyces* 等^[28–29]; 沈毅等从四川郎酒高温大曲中发现 *T. lanuginosus*、*A.*

cibarius 和 *Thermoascus* sp. 为主要优势菌种,且还存在一定数量的未知菌属^[30]。可知在种水平上 SMRT 测序技术更有利于揭示真菌群落组成情况,特别是小类菌种的组成(相对丰度<1%)。

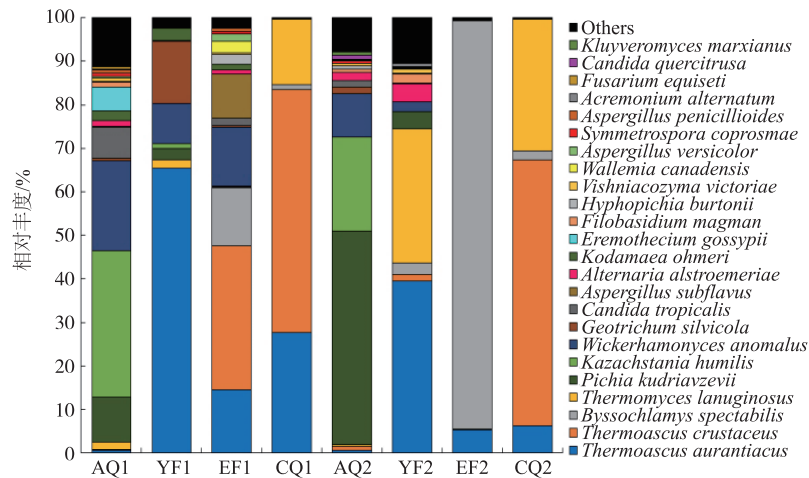


图 2 种水平上高温大曲中真菌群落组成

Fig. 2 Composition of fungal community in high-temperature *Daqu* at species level

2.2.3 主成分及物种相关性分析 基于优势菌种的相对丰度对样品进行主成分分析,见图 3。结果表明,AQ1 和 AQ2 样品真菌群落结构组成相似。到 YF 环节后,仿生机制曲与传统人工曲中真菌群落组成差异明显,YF 与 EF 环节可能是由于 B、C、D 类别中真菌含量上的差异导致 2 种大曲真菌群落组成差异明显;CQ 环节可能是由于 A 类别中真菌含量存在差异导致 2 种大曲真菌群落组成差异明显,即 2 种大曲中优势菌种由于含量的差异而造成仿生

机制曲与传统人工曲在 YF 至 CQ 环节呈现出差异性。

为进一步研究上述主要微生物之间的相互关系,选取属水平相对丰度大于 1% 的物种,计算其物种之间的斯皮尔曼等级相关系数,并筛选相关性大于 0.1 且 $P < 0.05$ 的数据构建物种相关性网络,结果见图 4。多数真菌属之间呈显著正相关调节机制,其中包括 55 个真菌属呈显著正相关,6 个真菌属呈显著负相关。这些复杂的生物学关系构成了高温大曲

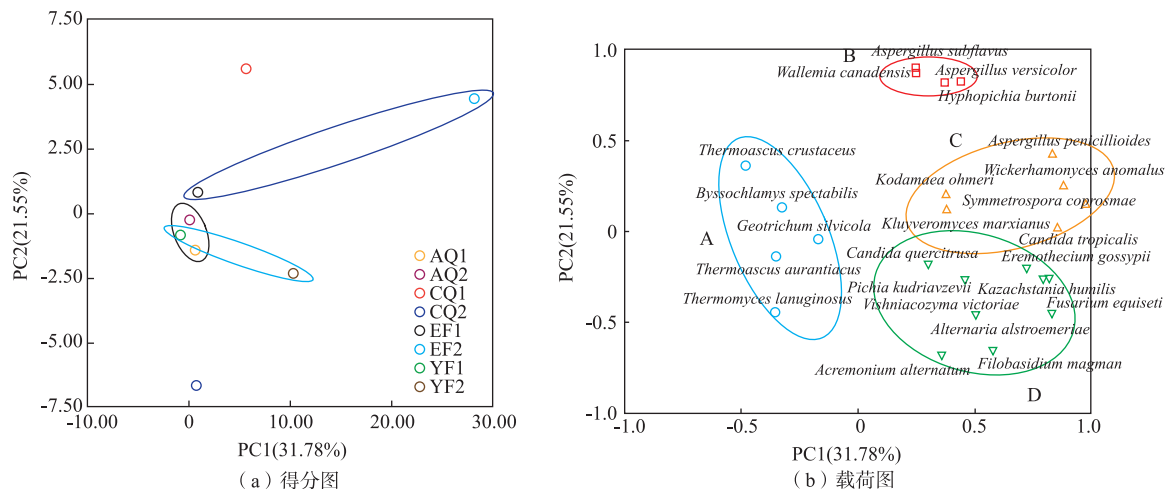
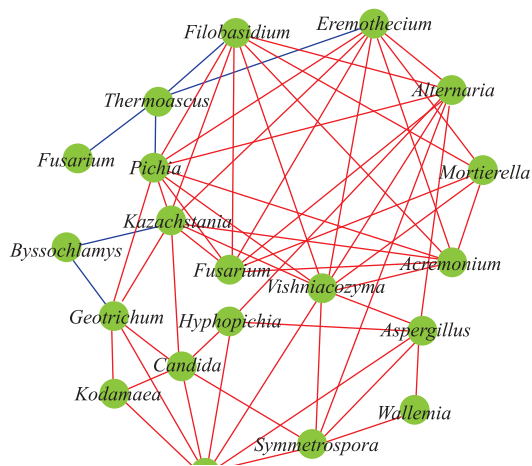


图 3 基于优势菌种相对丰度的主成分分析

Fig. 3 PCA analysis based on relative abundance of the dominant species

发酵过程的基本生物学调控机制,也是高温大曲发酵过程发酵动力、风味动力形成和调控机制的基本组成。由图 4 可知,*Thermoascus* 与 *Pichia*、*Filobasidium*、*Eremothecium* 和 *Fusarium* 等 4 种真菌属呈显著负相关,这 4 种菌属不管是仿生机制曲还是传统人工曲的含量都呈下降趋势,至曲坯发酵结束出仓已基本检测不出。*Bassochlamys* 与 *Kazachstania*、*Geotrichum* 呈显著负相关,*Pichia*、*Kazachstania*、*Candida*、*Wickerhamomyces* 等 4 种酵母呈显著正相关,它们在曲坯成型入仓环节含量最多,随着发酵的进行含量逐渐降低,这可能主要是受发酵温度的影响。



图中每个节点表示每个物种;连线的颜色表示正负相关性,红色表示正相关,蓝色表示负相关。

图 4 高温大曲制作过程真菌群落相关性网络图(属水平)
Fig. 4 Correlation network diagram of fungal communities in the process of high-temperature Daqu making at genus level

2.3 传统可培养方法与 SMRT 测序结果比较

采用传统可培养方法和 SMRT 测序技术在酱香型白酒高温制曲过程中都检出了 *W. anomalus*、*P. kudriavzevii*、*C. tropicalis*、*K. ohmeri*、*K. humilis*、*K. marxianus* 以及 *Aspergillus* 属丝状真菌,但 2 种方法鉴定结果存在差异。在 SMRT 测序结果中发现了大量的 *Thermoascus*、*Byssoschlamys* 及 *Thermomyces* 属丝状真菌和其他小类菌属,而传统可培养方法没有检出,却发现了一定量的 *S. cerevisiae*、*M. farinosa*、*T. ciferrii*、*C. lusitaniae*、*T. delbrueckii* 和 *R. pusillus*。2 种方法鉴定分析结果存在差异性的原因主要是:1)传统可培养方法中使用的培养基类别

太少,有待于进一步优化;2)在传统可培养方法中无法仅通过 ITS 区域测序分析实现对丝状真菌在种水平上准确的鉴定,如 *Aspergillus* 属丝状真菌。

作者选择 WL 培养基对高温大曲中酵母菌进行筛选分离,并结合菌落及显微形态对其进行初步分类,但同一种酵母菌由于菌株代谢差异,可能在 WL 培养基上呈现不同的菌落形态导致分类结果有偏差,但选择代表性菌落并结合 ITS 区域测序分析,可以较好地实现对酵母菌鉴定至种水平;而对丝状真菌进行分析鉴定时,作者发现 ITS 区域测序分析可能不适用于 *Aspergillus* 属丝状真菌种水平上的鉴定,这可能是导致在传统可培养方法和 SMRT 测序结果中出现的 *Aspergillus* 属不同种的原因,这在李营等的研究结果中也得到证实^[31],他们发现该属的 *A. lentulus* 和 *A. udagawae* 无法通过 ITS 测序进行准确区分鉴定。SMRT 测序技术与二代高通量测序技术相比,虽然具有读取序列长度长,精确度较高的优点,但其通量较低。同时,SMRT 测序结果准确性有赖于参考序列的长短及数据库的完整性。唐勇等研究发现,在 16S rRNA 基因的 SMRT 测序中,RDP 数据库在属及以上水平注释准确性较高,而 greengene 数据库具有种水平的注释优势,其建议在进行 SMRT 测序时,参考序列应该选择更长的基因序列或者综合多个数据库进行注释^[20-21]。基于此,我们也同时采用 UNITE 和 Genbank 数据库对测序数据进行注释比对,结果表明 UNITE 较 Genbank 数据库更适用于 ITS 区域全长序列的注释比对。但相关研究表明,在二代高通量测序技术中,Genbank 与 RDP、SILVA 数据库相比,更适用于真核微生物鉴定尤其是酵母菌的鉴定^[32],这可能与测序时选择的参考序列长短有关。因此,在后续的研究中,本课题组将进一步比较不同的真菌数据库结果。

3 结 语

作者采用传统可培养方法与 SMRT 测序技术对酱香型白酒仿生机制曲及传统人工曲发酵过程中真菌多样性及其特征进行了研究。结果表明,*W. anomalus*、*P. kudriavzevii*、*C. tropicalis*、*K. ohmeri*、*K. humilis*、*K. marxianus* 以及 *Aspergillus* 属丝状真菌,可同时通过传统可培养方法与 SMRT 测序技术检出,但在小类菌属鉴定分析上 SMRT 测序技术更显优势。通过 SMRT 测序共检出 6 个门、17 个纲、32

个目、64 个科、114 个属和 162 个种,且从曲坯成型入仓到发酵结束出仓,真菌多样性呈现逐渐降低的趋势,与传统可培养方法结果一致。主成分分析表明,仿生机制曲和传统人工曲仅在曲坯入房环节真菌群落组成相似。但从一次翻曲到曲坯发酵结束出仓,2 种大曲中真菌群落组成差异较大。主要表现为优势菌种丰度及小类菌种组成上存在差异,这可能与曲坯中水分、酸度和发酵温度有关。物种相关性分析结果表明,多数真菌属之间呈显著正相关调节机制,其中包括 55 个真菌属呈现显著正相关,6 个真菌属呈显著负相关,真菌群落微生物之间存在复杂的相互作用关系,在后续研究中我们将进一步阐明微生物演替代谢与大曲中风味物质之间的联系。

虽然传统可培养方法具有耗时较长、工作量大的缺点,但是我们采用 WL 培养基成功对高温大曲中酵母菌进行了快速初步分类,因此,WL 培养基可作为快速分类鉴定酵母菌的有效手段,我们将在后续的研究工作中构建酵母菌在 WL 培养基上菌落形态的数据库,以期更好地对酵母菌进行快速分类鉴定。对丝状真菌的鉴定后,仅发现了种类较少的丝状真菌,同时发现仅通过 ITS 区域测序分析无法实现对部分丝状真菌种水平上的准确鉴定。我们将在后续的研究中进一步对选择培养基进行优化,并结合丝状真菌的生长代谢特点,以期在后续的研究中

分离筛选到种类更加丰富的丝状真菌,为构建酱香型高温大曲分类标准提供参考。此外,传统可培养方法鉴定结果表明,部分酵母菌呈现出耐高温的特性,如 *M. farinosa* 和 *C. lusitaniae*,它们在酱香型白酒中的作用相关研究报道较少,有待于进一步阐明。

SMRT 测序技术作为第三代高通量测序技术的代表,同时具有测序序列长且测序错误率较低的优点^[20-21]。本研究结果表明,与第二代高通量测序技术相比,SMRT 测序技术更适用于在种水平上对真菌多样性进行分析。目前以 Roche454 和 Illumina 测序平台为主的第二代高通量测序技术在微生物多样性研究中仍是主力^[1],因为尽管 SMRT 测序错误率较低,且可以通过提高循环测序深度(passes)降低错误率,但是目前 SMRT 存在的系统错误及无法完全排除嵌合体序列干扰等问题仍是 SMRT 测序技术在微生物多样性研究中的挑战^[33]。

综上所述,酱香型白酒高温大曲发酵过程真菌群落组成丰富,仿生机制曲和传统人工曲在优势菌种丰度和小类菌种群落组成上存在较大差异,从而导致 2 种大曲从一次翻曲到发酵结束出仓呈现较大的差异性。本研究为挖掘高温大曲中功能酵母菌和丝状真菌以及进一步阐明高温大曲发酵机理奠定了基础。

参考文献:

- [1] YANG L, FAN W L, XU Y. GC/MS and UPLC-Q-TOF/MS based untargeted metabolomics coupled with physicochemical properties to reveal the characteristics of different type daqus for making soy sauce aroma and flavor type baijiu [J]. *LWT-Food Science and Technology*, 2021, 146: 111416.
- [2] ZHENG X W, TABRIZI M R, NOUT M J R, et al. Daqu-a traditional Chinese liquor fermentation starter[J]. *Journal of the Institute of Brewing*, 2012, 117(1): 82-90.
- [3] WU Q, ZHU Y, FANG C, et al. Can we control microbiota in spontaneous food fermentation? - Chinese liquor as a case example [J]. *Trends in Food Science & Technology*, 2021, 110: 321-331.
- [4] XU Y, WANG D, FAN W L, et al. Traditional Chinese Biotechnology[M]. Berlin: Springer-Verlag, 2010: 189-233.
- [5] WU Q, CHEN L Q, XU Y. Yeast community associated with the solid-state fermentation of traditional Chinese Maotai-flavour liquor[J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2013, 166(2): 323-330.
- [6] 滕巍,李国莹,刘小波,等. 大曲中产酯化酶菌株的分离鉴定及固体发酵工艺优化[J]. *食品与生物技术学报*, 2016, 35(9): 971-977.
- [7] JIN G Y, ZHU Y, XU Y. Mystery behind Chinese liquor fermentation[J]. *Trends in Food Science & Technology*, 2017, 63: 18-28.
- [8] 左乾程,黄永光,郭敏,等. 酱香型白酒机械化制曲发酵细菌群落的演替[J]. *食品科学*, 2021, 42(18): 150-156.
- [9] LIU H L, SUN B G. Effect of fermentation processing on the flavor of Baijiu[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*,

- 2018, 66(22): 5425-5432.
- [10] 曾凡君, 罗胜, 杨刚仁,等. 高温仿生机制曲在酱香习酒生产中的应用[J]. 酿酒科技, 2016, 263(5): 80-82.
- [11] 吴成, 王春晓, 王晓丹,等. 高通量测序技术在酿酒微生物多样性研究中的应用[J]. 食品科学, 2019, 40(3): 348-355.
- [12] 李豆南, 邱树毅. 酱香大曲微生物菌群结构及微生物功能研究概述[J]. 中国酿造, 2017(1): 5-11.
- [13] 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, 266(8): 87-90.
- [14] 郭敏. 基于高通量测序对酱香大曲制曲微生物生态多样性的研究[D]. 贵阳: 贵州大学, 2019.
- [15] 李静心, 王艳丽, 何宏魁,等. 基于高通量测序技术解析高温大曲和中高温大曲的真菌群落结构[J]. 食品与发酵工业, 2018, 44(12): 52-59.
- [16] 蒋英丽, 邓皖玉, 王亚军,等. 酱香高温大曲微生物菌群演化规律研究[J]. 酿酒科技, 2018, 294(12): 33-38.
- [17] 杨旭, 马歌丽, 王光路,等. 高通量测序解析白酒中高温大曲细菌和真菌群落结构[J]. 中国酿造, 2020,39(6): 119-123.
- [18] DENG L, MAO X, LIU D, et al. Comparative analysis of physicochemical properties and microbial composition in high-temperature Daqu with different colors[J]. **Frontiers in Microbiology**, 2020, 11: 588117.
- [19] 韩琬. 应用单分子实时测序技术对米曲中微生物多样性的研究[D]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学, 2016.
- [20] 唐勇, 刘旭. 基于 SMRT 测序技术的 16S rRNA 基因全长测序及其分析方法[J]. 生物技术通报, 2017, 33(8): 34-39.
- [21] 唐勇, 刘旭. SMRT 测序技术及其在微生物研究中的应用[J]. 生物技术通报, 2018, 34(6): 48-53.
- [22] WANG C X, WU C, QIU S Y. Yeast diversity investigation of *Vitis davidii* Foex during spontaneous fermentations using culture-dependent and high-throughput sequencing approaches[J]. **Food Research International**, 2019, 126(4): 108582.
- [23] JUNG E H, BAE Y W, KWUN S Y, et al. Isolation of xylitol-producing thermotolerant yeast *Millerozyma farinosa* from Nuruk[J]. **Korean Journal of Microbiology and Biotechnology**, 2019, 47(4): 530-535.
- [24] FAN G, LIU P, CHANG X, et al. Isolation and identification of a high-yield ethyl caproate-producing yeast from Daqu and optimization of its fermentation[J]. **Frontiers in Microbiology**, 2021, 12: 663744.
- [25] 方程, 杜海, 徐岩. 大曲丝状真菌的物种多样性及其次级代谢产物的合成潜力[J]. 食品与发酵工业, 2019,45(15): 1-8.
- [26] 周天慈, 何宏魁, 周庆伍,等. 基于高通量扩增子测序技术解析中高温大曲微生物来源[J]. 食品与发酵工业, 2021, 47(16): 66-71.
- [27] 张健, 李波, 程平言,等. 传统与仿生机制高温曲培养过程中生化指标的对比研究[J]. 酿酒科技, 2018, 291(9): 96-100.
- [28] WANG M Y, YANG J G, ZHAO Q S, et al. Research progress on flavor compounds and microorganisms of Maotai flavor baijiu. [J]. **Journal of Food Science**, 2019, 84(1): 6-18.
- [29] 黄永光, 徐岩. 酱香白酒酿造环境曲霉的分离及 *Aspergillus hennebergii* 酶分泌胁迫条件[J]. 食品与生物技术学报, 2015, 34(8): 814-821.
- [30] 沈毅, 程伟, 邓小波,等. 酱香高温大曲、酒醅和窖泥的真菌多样性分析[J]. 酿酒科技, 2019, 297(3): 17-23.
- [31] 李营, 屈平华, 陈东科,等. ITS 基因测序分析对 89 株病原真菌鉴定的应用评价[J]. 临床检验杂志, 2015, 33(11): 860-863.
- [32] WANG C X, GARCÍ A-FEMÁ NDEZ D, MAS A, et al. Fungal diversity in grape must and wine fermentation assessed by massive sequencing, quantitative PCR and DGGE[J]. **Frontiers in Microbiology**, 2015, 6: 01156.
- [33] SCHLOSS P D, JENIOR M L, KOUMPOURAS C C, et al. Sequencing 16S rRNA gene fragments using the PacBio SMRT DNA sequencing system[J]. **Peer J**, 2016, 4(3): e1869.