

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*
52(10):1290-1296; 4 October 2012
ISSN 0001-6209; CN 11-1995/Q
<http://journals.im.ac.cn/actamicrocn>

基于 26S rDNA D1/D2 序列分析酱香型白酒酒醅中酵母菌的群落结构

孙剑秋^{1,2,3}, 刘雯雯³, 臧威¹, 沈国娟¹, 平文祥^{2*}

¹绍兴文理学院生命科学学院, 绍兴 312000

²教育部农业微生物技术工程研究中心, 哈尔滨 150080

³齐齐哈尔大学生命科学与农林学院, 齐齐哈尔 161006

摘要:【目的】比较分析不同发酵阶段的酱香型白酒北大仓酒醅中酵母菌的群落结构。【方法】酒醅样本采集自黑龙江省北大仓白酒不同阶段的发酵窖池, 采用平板分离技术获得大量酵母菌纯培养物; 基于 26S rDNA D1/D2 区域的碱基序列, 准确鉴定酒醅中的酵母菌; 根据酵母菌的数量变化、种类组成、相对频率、多样性指数及其相似性系数, 研究酱香型北大仓白酒酒醅中酵母菌的群落结构特征。【结果】北大仓白酒酒醅中酵母菌数量在酿造过程中的变化, 遵循着“升高-降低-升高-降低”的规律; 第 1 轮“升高-降低”的过程表现出急剧的“速升速降”特点, 而第 2 轮“升高-降低”的过程则具有相对来说比较温和的“缓升缓降”特征。酒醅内的酵母菌鉴定为 8 属 13 种, 总体多样性指数处于较高的水平, 发酵初期酵母菌多样性指数逐渐增加, 最高的多样性指数 (1.89) 出现在发酵第 5 d 的酒醅内; 然后又逐渐下降, 发酵至第 11 d 时降至最低 (0.66); 酒醅发酵至 13 d 时开始直至发酵末期, 多样性指数呈现出波动性变化。北大仓白酒酒醅中酵母菌的种类组成总体来说比较接近, 大多数情况下相似性系数都高于 0.5, 说明在白酒酿造过程中酵母菌的组成和分布处于一个相对稳定的状态。对于北大仓白酒酒醅内存在的常见酵母菌来说, *Issatchenkia orientalis*、*Pichia kudriavzevii* 和 *Saccharomyces cerevisiae* 可能在酿造过程中发挥更重要的作用。【结论】北大仓等酱香型白酒的酒醅内存在着丰富的酵母菌资源, 阐明酒醅内酵母菌的群落结构可以为解析酱香型白酒的发酵机理提供基础数据和理论基础。**关键词:** 酵母菌, 群落结构, rDNA D1/D2 区域, 酒醅, 酱香型

中图分类号: Q938 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209 (2012) 10-1290-07

中国白酒属于世界著名的蒸馏酒, 一般根据香型分为酱香型、浓香型、清香型、米香型与兼香型等。其中酱香型是我国白酒的主导香型之一, 主要代表是贵州茅台镇生产的茅台酒, 所以这类白酒香型也被称为“茅香型”。酱香型白酒生产工艺复杂、生产周期较长, 整个酿造过程受到环境、原料、管理等多

种因素的影响^[1]。杨涛等^[2]对影响酱香型白酒质量的各种因素进行了总结和分析, 提出微生物区系的完善及微生物生态的优化是酱香型白酒生产的核心技术。各种微生物类群的协同作用, 在窖池内完成酒醅发酵过程, 影响着白酒的风格和质量^[3], 因此关于酒醅中微生物区系的研究一直倍受关

基金项目: 黑龙江省自然科学基金项目 (C200806); 绍兴文理学院引进人才科研启动项目 (20105021, 20105022)

* 通信作者。Tel: +86-451-88608046; E-mail: wenxiangp@yahoo.com.cn

作者简介: 孙剑秋 (1969-), 男, 黑龙江人, 教授, 博士, 硕士研究生导师, 主要从事酿造微生物资源方面的研究工作。E-mail: jianqius@163.com

收稿日期: 2012-04-16; 修回日期: 2012-05-20

注^[4-6]。与白酒酿造有关的微生物包括酵母菌和细菌、放线菌、霉菌等各种类群,传统理论认为酵母菌的主要作用是将糖转化成乙醇^[7],目前人们已经认识到酱香型白酒风格的形成与酒醅中酵母菌的作用密切相关^[8]。尽管对酒醅中酵母菌的多样性和分布进行研究还不能完全揭示酵母菌的功能和作用,但是阐明酒醅内酵母菌的群落结构可以为解析酱香型白酒的发酵机理提供基础数据和理论基础。

关于白酒酒醅中酵母菌资源的研究已有报道,主要是依赖于酵母菌的形态和生理特征而获得的一些成果^[7-9];目前人们认为,根据传统的酵母菌鉴定方法得出的结论有时是不可靠的^[10]。随着 DNA 序列分析技术的日益成熟,酵母菌的鉴定主要基于 26S rDNA D1/D2 区域的碱基序列进行;由于这些序列已经公布于 GenBank/EMBL/DDBJ 等国际核酸序列数据库,为准确鉴定酵母菌带来极大便利^[11]。尽管 DGGE 等分子生态学研究技术提升了酒醅内真菌资源的研究水平^[6],但是基于 26S rDNA D1/D2 区域的碱基序列,在大量分离酒醅内酵母菌培养物的基础上探讨酱香型白酒酒醅内的酵母菌多样性并阐明其群落结构,对于白酒生产的基础理论研究来说仍然有着非常重要的实践意义。

产自黑龙江省齐齐哈尔市的北大仓白酒,酱香明显、粮香突出、醇香馥郁、入口柔和绵甜、回味悠长、留香持久,因为具有北方酱香经典风格而被誉为“北国茅台”。北大仓白酒“四高一长(高温制曲、高温堆积、高温发酵、高温蒸馏、长期储存)”的独特酿造工艺,成为北方高寒地区白酒生产的典型。关于北大仓白酒酒醅中酵母菌群落结构的研究结果,在我国北方酱香型白酒的酒醅酵母菌研究方面具有一定代表性。

1 材料和方法

1.1 样品采集

2011 年 6-7 月于黑龙江北大仓集团有限公司的酱香型北大仓白酒窖池采样,池深 2 m,酿造周期 30 d。从开始发酵至酒醅出窖,分别于 1、3、5、7、9、11、13、15、20、25 和 30 d 共计采集样品 11 次;每次采样分为上、中、下 3 层,每层分为 3 点,采集酒醅样品用于酵母菌分离。

1.2 酒醅中酵母菌的分离与保藏

使用无菌水将采集的酒醅样品制成均匀悬液,系列稀释后选取合适稀释度的悬液涂布于 PDA 平板,20℃ 倒置培养 2-5 d。根据菌落特征随机挑取单个酵母菌菌落,分离纯化后置于 -80℃ 超低温冰箱内,保藏于绍兴文理学院生命科学学院。

1.3 DNA 提取、PCR 扩增和测序

酵母菌 DNA 的提取参照 Makimura *et al.* 方法进行^[12];26S rDNA D1/D2 区域的 PCR 扩增参照 Kurtzman 和 Robnett 方法进行^[13],NL1/NL4 引物对合成及其 PCR 产物测序由上海生物工程技术服务有限公司完成。

1.4 DNA 序列的比较分析

使用校正后的酵母菌株 D1/D2 区域的序列,在 GenBank 核酸序列数据库中进行同源序列搜索 (BLAST search)。根据试验菌株与已知酵母菌相应序列的相似程度对试验菌株作出鉴定,菌株间的序列比对采用 Clustal X 软件进行^[14]。

1.5 试验数据分析

数据使用 Microsoft Office Excel 整理,统计分析采用 SPSS 18.0 软件进行,多重比较方法采用邓肯氏新复极差检验 (Duncan's Multiple Range Test, DMRT) 进行,差异显著性水平为 0.05 ($P < 0.05$);酵母菌的 Shannon-Wiener 多样性指数和 Sorenson 相似性系数根据马克平 (1994) 方法计算。

2 结果和分析

2.1 酒醅中酵母菌数量的变化规律

从粮糟入窖发酵开始,北大仓白酒的酒醅在窖池中发酵周期为 30 d。在白酒整个酿造过程中,分别于 1、3、5、7、9、11、13、15、20 和 25 d 至第 30 d 出窖,分上中下 3 层采集酒醅样本,研究酒醅中酵母菌数量的变化规律。从图 1 可以看出,上层与下层酒醅中的酵母菌在发酵开始后数量迅速上升,第 3 天时酵母菌数量达到最多,然后又迅速下降;在 7-9 天时再次回升后直到第 11 天时酵母菌数量又降至第 5 天的水平,直至发酵结束酵母菌数量始终呈现逐渐减少的态势。中层酒醅内酵母菌的数量变化也表现出类似规律,只是在酵母菌数量第 2 次回落后稍显缓慢,直至第 13 天才降至第 5 天的数量水平。

2.2 酒醅中酵母菌的种类组成

在北大仓白酒的酿造过程中,从酒醅样本中共分离到酵母菌 394 株。目前国际上公认的酵母菌分类标准一般认为,如果试验菌株的 D1/D2 序列与已知种的相似性在 99% 以上,可以对菌株做出种的鉴定。根据酵母菌株 26S rDNA D1/D2 区域的碱基序列比对结果,394 株酵母菌的 D1/D2 序列与已知种的相似性在 99% - 100%,遵循酵母菌分类原则鉴定为 8 属 13 种;包括 2 种 *Candida*、1 种 *Dekkera*、1 种 *Issatchenkia*、2 种 *Kazachstania*、4 种 *Pichia*、1 种 *Saccharomyces*、1 种 *Schizosaccharomyces* 和 1 种 *Wickerhamomyces* (表 1)。根据表 1 可以看出,*Pichia kudriavzevii* 和 *Saccharomyces cerevisiae* 两种酵母菌的数量较大,而且在酒醅发酵过程中一直可以分离到,

相对频率始终在 10% 以上;第 3 种比较常见的酵母菌是 *Issatchenkia orientalis*,除第 11 天和第 25 天的酒醅之外,其余的 9 次样本内均有发现。另外,*Candida ethanolica*、*Dekkera bruxellensis*、*Schizosaccharomyces pombe* 和 *Wickerhamomyces anomalus* 等 4 种酵母菌在发酵 25 d 的酒醅内以 10% 的相对频率出现;*Candida humilis* 在发酵第 5 天的酒醅中相对频率高于 10%,说明以上几种酵母菌偶尔以常见种类存在于北大仓白酒的酒醅内;*Kazachstania barnettii*、*Kazachstania exigua*、*Pichia anomala*、*Pichia manshurica* 和 *Pichia sp.* (sp. nov.) 等 5 种酵母菌在北大仓白酒的酿造过程中,应该属于出现频率较低的稀有种类。

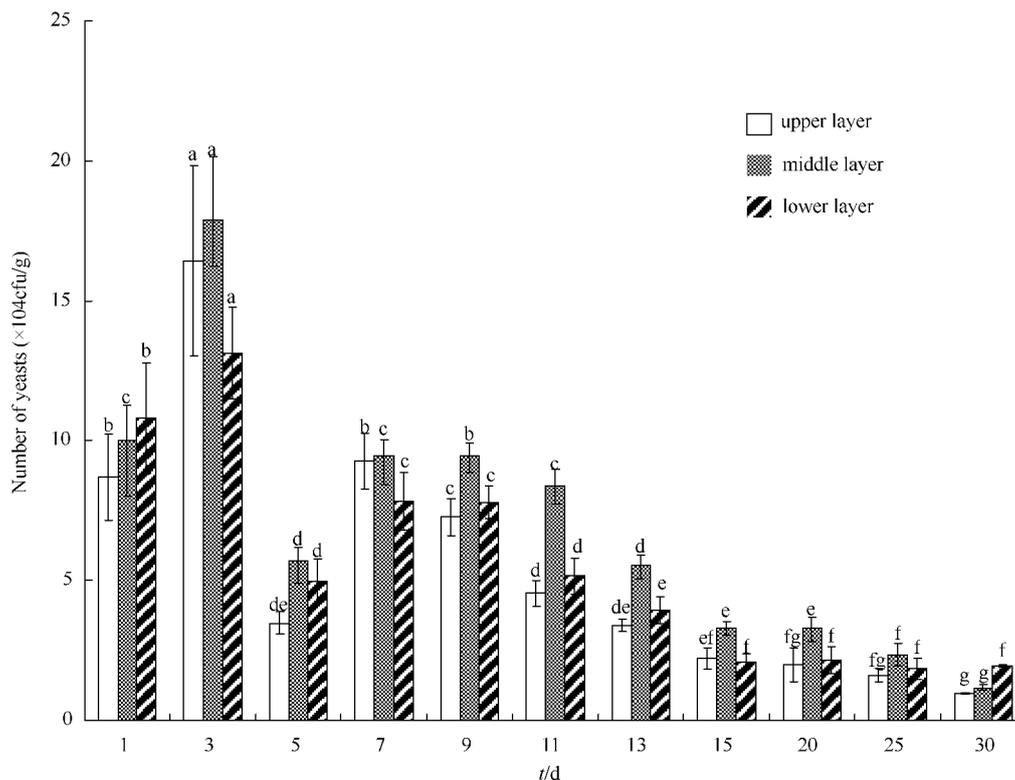


图 1 不同发酵阶段的酒醅中酵母菌数量变化规律

Fig. 1 The change of yeast numbers in fermenting grains. The same letters on the bars of the different stages of grain fermentation are not significantly different at $P < 0.05$.

2.3 酒醅中酵母菌的多样性与相似性

在北大仓白酒酒醅发酵过程中共采集样本 11 批次,每次采集的酒醅样品内酵母菌的组成不尽相同(表 1)。根据表 2 可知,酒醅内的酵母菌总体多样性指数基本处于较高的水平,11 个批次的酒醅样本中

酵母菌的多样性指数有 8 次超过 1。发酵初期,酵母菌多样性指数逐渐增加,最高的多样性指数 (1.89) 出现在发酵第 5 天的酒醅内,然后又逐渐下降,发酵至第 11 天时降至最低 (0.66);酒醅发酵至 13 d 开始直至发酵末期,多样性指数呈现出波动性变化。

表 1 不同发酵阶段的酒醅中酵母菌种类组成和相对频率(RF%)

Table 1 Relative frequency (RF%) and species distribution of yeasts in different stages of grain fermentation

Taxon	1 d		3 d		5 d		7 d		9 d		11 d		13 d		15 d		20 d		25 d		30 d		
	No.	RF%	No.	RF%	No.	RF%	No.	RF%	No.	RF%	No.	RF%	No.	RF%									
<i>Candida ethanolica</i>																				2	10		
<i>Candida humilis</i>					4	11.8	2	4.3									2	6.3					
<i>Dekkera bruxellensis</i>			4	6.5							2	5.6	2	6.7	2	11.1	4	12.5	2	10			
<i>Issatchenkia orientalis</i>	6	11.5	10	16.1	6	17.6	12	26.1	2	4.5			2	6.7	2	11.1	4	12.5			2	10	
<i>Kazachstania barnettii</i>					2	5.9																	
<i>Kazachstania exigua</i>													2	6.7									
<i>Pichia anomala</i>													2	6.7			2	6.3					
<i>Pichia kudriavzevii</i>	20	38.5	28	45.2	10	29.4	14	30.4	20	45.5	6	16.7	12	40	6	33.3	4	12.5	6	30	14	70	
<i>Pichia manshurica</i>					2	5.9																	
<i>Pichia</i> sp. (sp. nov.)					2	5.9																	
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	24	46.2	20	32.3	6	17.6	18	39.1	22	50	28	77.7	10	33.3	8	44.4	16	50	6	30	4	20	
<i>Schizosaccharomyces pombe</i>																					2	10	
<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	2	3.8			2	5.9															2	10	
Total	52	100	62	100	34	100	46	100	44	100	36	100	30	100	18	100	32	100	20	100	20	100	

表 2 不同发酵阶段的酒醅中酵母菌 Shannon-Wiener 多样性指数

Table 2 Shannon-Wiener diversity indices of yeasts in different stages of grain fermentation

Fermentation time	1 d	3 d	5 d	7 d	9 d	11 d	13 d	15 d	20 d	25 d	30 d
Diversity indices	1.10	1.20	1.89	1.22	0.84	0.66	1.46	1.21	1.47	1.64	0.81

根据酒醅中酵母菌的 Sorenson 相似性系数(表 3)发现,北大仓白酒酒醅中酵母菌的种类组成总体来说比较接近,大多数情况下相似性系数都高于 0.5,说明在北大仓白酒酿造过程中酵母菌的组成和分布处于一个相对稳定的状态。在发酵第 5 d 的酒醅中,由于受到 *Kazachstania barnettii*、*Pichia manshurica* 和 *Pichia* sp. (sp. nov.) 等稀有种类集中出现的影响,使酵母菌组成的相似性系数处于一个相对较低的水平(表 3);发酵第 25 天的酒醅中,一些在其它发酵阶段不易分离到的酵母菌种类以较高的频率出现在酒醅内,例如 *Candida ethanolica*、

Schizosaccharomyces pombe 和 *Wickerhamomyces anomalus* 等,结果导致酒醅内酵母菌组成的相似程度明显降低。

3 讨论

酱香型是我国白酒的主导香型之一,风格独特的香型形成与酒醅中微生物的群落组成密切相关,弄清酒醅中酵母菌类群的消长规律,对于深入探讨酱香型白酒的酿造机制具有积极意义。研究发现,北大仓白酒酒醅中酵母菌数量在酿造过程中的变

化,遵循着“升高-降低-升高-降低”的规律;第1轮“升高-降低”的过程表现出急剧的“速升速降”特点,而第2轮“升高-降低”的过程则具有相对来说比较温和的“缓升缓降”特征。另外,酒醅中酵母菌数量的两次增加过程均出现在酿造前期,酿造中后期酒醅内酵母菌的数量一直处于第2轮“升高-降低”过程的缓慢下降阶段,这种酵母菌数量减少的态势一直持续到发酵结束;酿造中后期酵母菌数量的减少,可能是因为酒醅长期处于厌氧和酸性环境中,一

些有机酸的积累不利于酵母菌的大量增殖^[16]。张煜行等^[16]在研究衡水老白干酒醅内的微生物变化时,也发现了酒醅中酵母菌数量变化的类似规律;不同的是,在衡水老白干的酒醅中,酵母菌数量的两次峰值分别出现在发酵第6天和第15天的酒醅中。我们因此推测,在白酒酿造过程中酒醅内酵母菌的数量变化可能基本遵循着“升高-降低-升高-降低”规律,但是不同香型、不同种类的白酒酒醅内酵母菌的数量变化会表现出不同的特点。

表3 不同发酵阶段的酒醅中酵母菌 Sorenson 相似性系数

Table 3 Sorenson's similarity coefficients of yeasts in different stages of grain fermentation

Fermentation time/d	3 d	5 d	7 d	9 d	11 d	13 d	15 d	20 d	25 d	30 d
1	0.75	0.67	0.75	0.85	0.57	0.6	0.75	0.6	0.6	0.85
3		0.5	0.75	0.85	0.57	0.8	1	0.8	0.6	0.85
5			0.67	0.55	0.36	0.43	0.5	0.57	0.43	0.55
7				0.85	0.57	0.6	0.75	0.8	0.4	0.85
9					0.67	0.67	0.85	0.67	0.44	1
11						0.6	0.85	0.67	0.67	0.67
13							0.8	0.83	0.5	0.67
15								0.8	0.6	0.67
20									0.6	0.67
25										0.57

酒醅内酵母菌的 Shannon-Wiener 多样性指数处于 0.66 - 1.89 的水平。最高的多样性指数出现在发酵第5天的酒醅中(表2),但是第5天的酒醅内酵母菌的数量却处于低谷(图1),可见酒醅内酵母菌数量减少的时期不一定引起酵母菌多样性水平的降低。根据研究结果,酒醅内酵母菌的 Sorenson 相似性系数比较高,说明北大仓白酒酿造过程中酵母菌的种类组成与分布是处于略有波动的相对平稳状态。对于北大仓白酒的整个生产过程来说, *Candida ethanolica*、*Candida humilis*、*Dekkera bruxellensis*、*Issatchenkia orientalis*、*Pichia kudriavzevii*、*Saccharomyces cerevisiae*、*Schizosaccharomyces pombe*、*Wickerhamomyces anomalus* 属于常见种类,而 *Kazachstania barnettii*、*Kazachstania exigua*、*Pichia anomala*、*Pichia manshurica* 和 *Pichia sp.* (sp. nov.) 属于酒醅内的稀有酵母。其中, *Pichia sp.* (sp. nov.) 的 26S rDNA D1/D2 区域的碱基序列在 GenBank 核酸序列数据库的搜索 (BLAST search) 结果表明,与近缘已知种类的相似性仅为 88%,基本确定属于新种,可见在白酒窖池这样多年来广受关注的生境内仍然存在着有待发现的酵母菌新资源。

根据相对频率,对于北大仓白酒酒醅内存在的常见酵母菌来说, *Issatchenkia orientalis*、*Pichia kudriavzevii* 和 *Saccharomyces cerevisiae* 可能在酿造过程中发挥更重要的作用。Tofalo et al.^[17] 发现 *Issatchenkia orientalis* 能够产生柠檬酸、酒石酸、苹果酸等有机酸类物质,徐艳文等^[18] 认为 *Issatchenkia orientalis* 可以产生大量的高级醇,所以这种酵母菌在酒醅中的功能可能主要是影响白酒中香味物质的形成。另外, *Issatchenkia orientalis* 在代谢过程中产生的少量乙醛,又可以参与乙醇发酵过程进而影响酒醅内进行的乙醇发酵^[18]。 *Pichia kudriavzevii* 是始终存在于北大仓白酒酒醅内优势种类, Oberoi 等^[19] 发现这种酵母菌具有很强的乙醇产生能力,在适宜的条件下产生乙醇的能力甚至高于 *Saccharomyces cerevisiae*。但是一般认为, *Saccharomyces cerevisiae* 在酿造过程中表现出最强的乙醇形成能力,对于乙醇形成来说起着关键作用^[20,21]; 同时由于 *Saccharomyces cerevisiae* 还可以产生丙醇、丁醇、戊醇、乙酸戊酯等挥发性化合物,对白酒的香型形成产生重要影响^[21], 因此 *Saccharomyces cerevisiae* 应该是北大仓白酒生产过程中最重要的酵母菌。

致谢: 关于酵母菌 26S rDNA D1/D2 区域的序列分析是在中国科学院微生物研究所真菌学国家重点实验室白逢彦研究员课题组的指导下完成, 深表谢意。

参考文献

- [1] 刘宇驰, 云敏. 酱香型白酒酿造过程主要影响因素的分析. 酿酒科技 (*Liquor-making Science and Technology*), 2011, 8: 65-67.
- [2] 杨涛, 梁明锋, 李国友, 吴林蔚, 庄名扬. 微生物技术在酱香型白酒生产中的应用研究. 酿酒科技 (*Liquor-making Science and Technology*), 2011, 4: 20-24, 28.
- [3] Wang CL, Shi DJ, Gong GL. Microorganisms in *Daqu*: a starter culture of Chinese *Maotai-flavor* liquor. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 2008, 24: 2183-2190.
- [4] Wu ZY, Zhang WX, Zhang QS, Hu C, Wang R, Liu ZH. Developing new sacchariferous starters for liquor production based on functional strains isolated from the pits of several famous *Luzhou-flavor* liquor brewers. *Journal of the Institute of Brewing*, 2009, 115 (2): 111-115.
- [5] Zhang WX, Wu ZY, Zhang QS, Wang R, Li H. Combination of newly developed high quality *Fuqu* with traditional *Daqu* for *Luzhou-flavor* liquor brewing. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 2009, 25: 1721-1726.
- [6] Shi S, Zhang L, Wu ZY, Zhang WX, Deng Y, Zhong FD, Li JM. Analysis of the fungi community in multiple- and single-grains *Zaopei* from a *Luzhou-flavor* liquor distillery in western China. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 2011, 27: 1869-1874.
- [7] 周瑞平, 陈云宗, 游玲. 多粮浓香型白酒糟醅中的酵母菌区系的初步研究. 酿酒科技 (*Liquor-making Science and Technology*), 2010, 3: 34-36, 39.
- [8] 庄名扬, 孙达孟. 酱香型白酒高温堆积糟醅中酵母菌分离、选育及其分类学鉴定. 酿酒 (*Liquor Making*), 2003, 30 (2): 12-13.
- [9] 任道群, 唐玉明, 姚万春, 卓毓崇, 云敏, 何世兴. 酱香型酒糟醅酵母菌的初步分类及选育. 酿酒 (*Liquor Making*), 2007, 34 (6): 44-46.
- [10] 白逢彦, 贾建华, 梁慧燕. 假丝酵母属疑难菌株大亚基 rDNA D1/D2 区域序列分析及其分类学意义. 菌物系统 (*Mycosystema*), 2002, 21 (1): 27-32.
- [11] 陆惠中, 王启明, 贾建华, 白逢彦. 秦岭地区子囊菌酵母物种多样性研究. 菌物学报 (*Mycosystema*), 2004, 23 (2): 183-187.
- [12] Makimura K, Murayama YS, Yamaguchi H. Detection of a wide range of medically important fungi by the polymerase chain reaction. *Journal of Medical Microbiology*, 1994, 40: 358-364.
- [13] Kurtzman CP, Robnett CJ. Identification of clinically important ascomycetous yeasts based on nucleotide divergence in the 5' end of the large-subunit (26S) ribosomal DNA gene. *Journal of Clinical Microbiology*, 1997, 35: 1216-1223.
- [14] Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F, Higgins DG. The Clustal X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research*, 1997, 24: 4876-4882.
- [15] 马克平. 生物群落多样性的测度方法 // 钱迎倩, 马克平主编. 生物多样性研究的原理与方法. 北京: 中国科学技术出版社, 1994, 141-165.
- [16] 张煜行, 黄建华, 王明远, 杜惠丽, 赵长新. 衡水老白干酒醅发酵主要酶活与微生物变化. 酿酒科技 (*Liquor-making Science and Technology*), 2007, 3: 32-34.
- [17] Tofalo R, Schirone M, Telera GC, Manetta AC, Corsetti A, Suzzi G. Influence of organic viticulture on non-Saccharomyces wine yeast populations. *Annals of Microbiology*, 2011, 61: 57-66.
- [18] 徐艳文, 刘爱国, 刘延琳, 王泽举. 甘肃莫高葡萄酒厂酵母种群的生态分布. 生态学报 (*Acta Ecologica Sinica*), 2009, 29 (6): 3090-3095.
- [19] Oberoi HS, Babbar N, Sandhu SK, Dhaliwal SS, Kaur U, Chadha BS, Bhargav VK. Ethanol production from alkali-treated rice straw via simultaneous saccharification and fermentation using newly isolated thermotolerant *Pichia kudriavzevii* HOP-1. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 2012, 39: 557-566.
- [20] Li EH, Liu AG, Xue B, Liu YL. Yeast species associated with spontaneous wine fermentation of Cabernet Sauvignon from Ningxia, China. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 2011, 27: 2475-2482.
- [21] Sujaya N, Antara NS, Sone T, Tamura Y, Aryanta WR, Yokota A, Asano K, Tomita F. Identification and characterization of yeasts in *brem*, a traditional Balinese rice wine. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*. 2004, 20: 143-150.

Composition and distribution of yeasts at different fermentation stages for *Maotai-flavor* Chinese liquor production

Jianqiu Sun^{1,2,3}, Wenwen Liu³, Wei Zang¹, Guojuan Shen¹, Wenxiang Ping^{2*}

¹ Life Science College, Shaoxing University, Shaoxing 312000, China

² Engineering Research Center for Agricultural Microbial Biotechnology, Ministry of Education, Harbin 150080, China

³ Life Science College, Qiqihaer University, Qiqihaer 161006, China

Abstract: [Objective] In order to collect basic data for the analysis of metabolic mechanism, the composition and distribution patterns of yeasts at different fermentation stages for *Maotai-flavor* Chinese liquor production. [Methods] By using plate screening techniques, a large number of yeast cultures were obtained from fermenting grains. Based on 26S rDNA D1/D2 region sequencing, the yeasts were identified. According to quantitative change, species composition, relative frequency, diversity indices and similarity coefficients, the composition and distribution patterns of yeasts were studied. [Results] The numbers of yeasts in fermenting grains showed a rule of “higher-lower-higher-lower”. A total of 13 species, 8 genera of the yeasts were identified. The whole diversity index of the yeasts was comparatively high. That the similarity coefficient in most cases was significantly higher than 0.5 showed that the species composition and distribution of yeasts were relatively stable. *Issatchenkia orientalis*, *Pichia kudriavzevii* and *Saccharomyces cerevisiae* play a very important role in the process of liquor fermentation. [Conclusion] There were abundant yeast resources in fermenting grains of *maotai-flavor* liquor.

Keywords: yeast, community composition, rDNA D1/D2 region, fermenting grains, *maotai-flavor*

(本文责编:张晓丽)

Supported by the Natural Science Foundation of Heilongjiang Province (C200806) and by the Introduction of Shaoxing University Scientific Research Grants Project (20105021, 20105022)

* Corresponding author. Tel: +86-451-88608046; E-mail: wenxiangp@yahoo.com.cn

Received: 16 April 2012/Revised: 20 May 2012

系统发育树的构建方法

构建系统树是为了鉴定菌株的分类学地位,应该使用正确的方法构建。具体要求如下:

1. 将鉴定菌的 16S rRNA 序列递交 GenBank,用 Blast 软件搜索相似的 16S rRNA,然后一起构树。
2. 采用能反应分支长度的软件(如 NJ 法),并用 Bootstrap 值分析分支聚类的稳定性。
3. 用国际较为通用的一些建树方法,如 Neighbour - Joining 等,这样结果就更为可靠,更直观。
4. 请严格按照下列具体要求写作 [参见:微生物学报,2004,44(2):143.]

① 系统树中:菌名应列出全称,且属和种名应斜体,名称后再加括号,其内含序列号。

② 图注(本刊的图注要求用英文写作):应表明“树”上所有的内容,包括:括号中的序号、分支点上的数字涵义、0.01 代表的意义。

③ 作图要求:要求达到印刷清晰,字体为“Time New Roman”,字号为“8p”。可以选用两种方式——(A)文件格式为“*.Tif”,分辨率为 600 线;(B)文件格式为“word”,画出树,输入文字。