

# 强化异常威客汉姆酵母对白酒酿造中微生物结构及酯类合成的影响

石馨<sup>1</sup>, 惠明<sup>1,2\*</sup>, 田青<sup>1</sup>, 王洪照<sup>3</sup>

(<sup>1</sup>河南工业大学 生物工程学院 郑州 450001

<sup>2</sup>工业微生物菌种保藏与选育河南省工程研究中心 郑州 450001

<sup>3</sup>河南豫坡酒业有限责任公司 河南驻马店 463900)

**摘要** 异常威客汉姆酵母在白酒酿造中利于酯类化合物的合成。酯类是白酒的重要风味物质,其种类、含量对白酒的品质起至关重要的作用。采用模拟固态发酵技术研究白酒生产中人工添加异常威客汉姆酵母改善白酒风味物质的机制。试验共分为两组:空白组(a组)和添加异常威客汉姆酵母 Y-1(b组),取不同发酵时期的酒醅样进行 GC-MS 分析,结果表明添加 Y-1 菌株可显著提高酒醅样品中酯类及其它风味物质的含量,其中 b 组中浓香型白酒主体酯己酸乙酯含量显著高于 a 组 ( $P<0.05$ ),发酵 25 d 时 b 组中己酸乙酯含量 ( $856.1\pm 4.00$ )mg/L。分别对发酵过程中两组酒醅进行高通量测序,Alpha 多样性结果表明 b 组细菌群落多样性和丰富程度皆高于 a 组,而真菌的多样性和丰度较相似,各属间丰度有一定差异。结论:利用异常威客汉姆酵母发酵生产白酒,通过生物强化作用改变己酸乙酯含量,从而导致其它风味物质的变化,该变化主要是由添加异常威客汉姆酵母引起微生物结构的变化所致,说明异常威客汉姆酵母 Y-1 具有提升固态发酵白酒风味物质的能力,尚需在实际生产中做进一步验证。

**关键词** 异常威客汉姆酵母;白酒固态发酵;微生物强化;高通量测序技术

**文章编号** 1009-7848(2024)06-0278-10 **DOI**: 10.16429/j.1009-7848.2024.06.024

白酒基酒的品质受原辅料、发酵工艺、环境条件及微生物菌群结构的影响,其中功能微生物在发酵过程中的强化对原酒的风味品质有着重要的作用<sup>[1-3]</sup>。据报道,异常威客汉姆酵母(*Wickerhamomyces anomalus*)在发酵过程中可产生酯类、醇类和有机酸等风味物质,对白酒香气的形成具有重要作用,常作为发酵食品、白酒酿造的重要功能微生物<sup>[4-6]</sup>。近年来,高通量测序技术发展迅速,被认为是发现微生物群落更替和功能转移的重要工具,广泛应用于混菌发酵实践中微生物群落结构及功能的研究<sup>[7-8]</sup>。例如:张明珠等<sup>[9]</sup>基于高通量测序研究了窖泥原核微生物群落结构,并对其理化性质进行相关性分析,结果发现窖泥水分含量、pH 值和铵态氮对菌群的影响最为显著。Wang 等<sup>[10]</sup>通过高通量测序分析白酒发酵中添加异常威客汉姆酵母导致风味变化的主要原因是异常威客汉姆酵母引起酒醅微生物群落结构的变化。本研

究以实验室分离筛选的异常威客汉姆酵母 Y-1 菌株为出发菌,将其应用于白酒模拟固态发酵,利用 GC-MS 和高通量测序分析该菌株对发酵过程中酒醅微生物群落结构及风味物质的影响,期为改善白酒的风味提供参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

试验菌株:异常威客汉姆酵母 Y-1,由工业微生物菌种保藏与选育河南省工程实验室筛选和保藏。

采集发酵第 5,10,15,20,25 天的酒醅,取样时分别取坛子上层、中层及下层,将其混合均匀备用,具体采集方法参考戴奕杰等<sup>[11]</sup>的方法。

2-辛醇(色谱纯),兰州东立龙公司;DNA 抽提试剂盒,Omega 公司;建库试剂盒,Bio Scientific 公司;测序试剂盒,Illumina 公司。

### 1.2 主要仪器与设备

气相色谱仪 Trace 1300、质谱仪 ISO 7000,赛默飞世尔科技有限公司;酶标仪,Biotek;PCR 仪,美国 ABI 公司;测序仪,Illumina 公司。

收稿日期:2023-06-12

基金项目:河南白酒生态酿造关键技术研发与示范应用项目(231111112000)

第一作者:石馨,女,硕士生

通信作者:惠明 E-mail: huiming@haut.edu.cn

### 1.3 试验方法

1.3.1 白酒固态模拟发酵 白酒酿造流程如图1所示。具体酿造方法参考江伟等的方法<sup>[12]</sup>。分别添加微生物:a组添加原料粮12%的大曲;b组添加原料粮12%的大曲+原料粮0.02%异常威客汉姆酵母 Y-1 种子液,发酵期为25 d。

1.3.2 风味物质的检测 称取酒醅样品2 g于150 mL的三角瓶内,向瓶内加入30 mL饱和食盐水,用移液枪准确加入5  $\mu$ L(0.072 g/L)色谱纯2-辛醇内标液,放入一颗磁力搅拌转子,用保鲜膜将瓶口密封。插入50/30  $\mu$ m DVB/CAR/PDMS fibre萃取头,纤维头置于三角瓶上部空间,50  $^{\circ}$ C平衡10 min,平衡结束后120 r/min转速下萃取50 min,萃取结束后取出手柄,直接进GC-MS分析。色谱、质谱条件:参考文献<sup>[13]</sup>。

1.3.3 DNA提取、PCR扩增及高通量测量 DNA提取、PCR扩增及高通量测序参考戴奕杰等<sup>[14]</sup>的方法

1.3.4 数据处理 使用fastp<sup>[15]</sup>软件对原始测序序列进行质控;使用FLASH<sup>[16]</sup>软件进行拼接;使用UPARSE<sup>[17-18]</sup>软件进行OTU聚类并剔除嵌合体;利用RDP classifier<sup>[19]</sup>进行物种分类注释。

## 2 结果与分析

### 2.1 两组酒醅主要挥发性物质的GC-MS分析

利用GC-MS对a、b两组酒醅不同发酵时期的挥发性物质进行检测,部分挥发性物质种类及相对含量如表1所示。由表1可以看出,整个发酵过程中空白组(a)、异常威客汉姆酵母Y-1组(b)的挥发性物质含量不同。比如苯乙醇、异戊醇等醇类物质,根据明红梅等<sup>[9]</sup>研究表明异常威客汉姆酵母具有较强的产苯乙醇能力,使成品酒余味甘甜、清香。醇类含量过低会缺乏白酒传统风味,但是含量过高也会导致酒的涩味增大。b组中的异戊醇含量高于a组,说明该酵母对异戊醇的提高有一定作用,但是如果异戊醇含量过高的话也会使白酒产生涩味,所以在利用异常威客汉姆酵母进行生物强化时,要实时检测挥发性成分的变化。b组的酯类含量也高于a组,尤其是己酸乙酯,说明异常威客汉姆酵母Y-1菌株对酒醅中己酸乙酯含量的提高有明显作用。除己酸乙酯外,a、b两组中

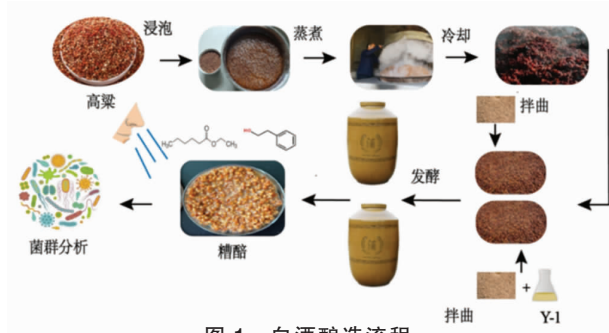


图1 白酒酿造流程

Fig.1 Liquor brewing process

的乙酸苯乙酯、十六酸乙酯等酯类含量也不同,这些酯类物质在白酒中都具有独特的气味<sup>[20]</sup>。除此之外,b组酒醅中还检测出愈创木酚、4-甲基愈创木酚、苯酚3种有益风味因子。愈创木酚具有抗氧化、抗肿瘤和增强人体免疫力的作用<sup>[21-22]</sup>。

### 2.2 酒醅细菌群落 Alpha 多样性分析

对10个样本酒醅细菌的16S rDNA V3-V4区进行高通量测序,经统计,样品序列数为418 607,平均序列长度426 bp。两组样本Alpha多样性汇总如表2所示,b组样本除shannon指数外,其它3个指数皆高于a组,说明b组细菌群落多样性和丰富程度皆高于a组。Wang等<sup>[10]</sup>研究发现,添加异常威客汉姆酵母会使白酒固态发酵时的细菌结构发生改变,提高细菌物种多样性,与本研究结果相一致。coverage指数分别为99.97%,99.90%,说明本次测序结果可以代表样品中微生物真实情况。

### 2.3 酒醅细菌群落物种组成

经OTU注释,两组样品中共检测出12个可鉴定门。3个优势菌门如图2a所示,占每个样品总丰度的99.9%以上,在所有样本的细菌微生物群落结构中厚壁菌门(Firmicutes)占绝对优势菌群,与应静<sup>[23]</sup>、游玲等<sup>[24]</sup>的研究结果一致。在纲水平上,共检测出21个可鉴定纲。4个优势纲(相对丰度大于1%),如图2b所示,分别为芽孢杆菌纲(Bacilli)、 $\alpha$ -变形菌纲(Alphaproteobacteria)、变形菌纲(Gammaproteobacteria)、放线菌纲(Actinobacteria)。

在属水平上,共鉴定出89个可鉴定属。13个优势属如图2c所示,分别为乳酸菌属(*Lactobacillus*)、魏斯氏菌属(*Weissella*)、醋杆菌属(*Acetobac-*

表1 发酵过程中酒酯的部分挥发性物质种类及含量  
Table 1 Types and contents of some volatile substances in fermented grains

物质含量/ (mg/L)	阈值/ ( $\mu\text{g/L}$ )	5 d			10 d			15 d			20 d			25 d			OVA	
		a	b	a	b	a	b	a	b	a	b	a	b	a	b	a	b	
苯乙醇	400.96	237.40 ± 8.0 <sup>b</sup>	308.90 ± 8.5 <sup>a</sup>	300.30 ± 5.6 <sup>b</sup>	894.90 ± 22.9 <sup>a</sup>	400.10 ± 11.1 <sup>b</sup>	661.45 ± 1 <sup>a</sup>	277.00 ± 12.0 <sup>b</sup>	937.00 ± 1.74 <sup>a</sup>	486.37 ± 9 <sup>b</sup>	845.47 ± 4.1 <sup>a</sup>	12.13	21.08					
异戊醇	—	146.70 ± 5.2 <sup>b</sup>	389.20 ± 10.3 <sup>a</sup>	7.5 <sup>b</sup>	562.80 ± 21.6 <sup>a</sup>	341.70 ± 11.1 <sup>b</sup>	454.40 ± 5.1 <sup>a</sup>	353.00 ± 12.0 <sup>b</sup>	734.00 ± 5.15 <sup>a</sup>	400.90 ± 8.6 <sup>b</sup>	902.60 ± 11.0 <sup>a</sup>	—	—	—	—	—	—	
异丁醇	—	16.39 ± 1.6 <sup>b</sup>	21.80 ± 1.2 <sup>a</sup>	7.3 <sup>b</sup>	60.86 ± 5.5 <sup>a</sup>	23.98 ± 1.9 <sup>b</sup>	19.60 ± 1.5 <sup>b</sup>	19.04 ± 1.0 <sup>b</sup>	47.50 ± 2.1 <sup>a</sup>	23.50 ± 1.4 <sup>b</sup>	51.30 ± 4.1 <sup>a</sup>	—	—	—	—	—	—	
异辛醇	—	9.40 ± 1.6 <sup>a</sup>	7.82 ± 1.4 <sup>a</sup>	15.30 ± 4.1 <sup>b</sup>	31.11 ± 3.8 <sup>a</sup>	52.38 ± 5.1 <sup>a</sup>	57.60 ± 11.5 <sup>a</sup>	15.70 ± 2.2 <sup>b</sup>	21.80 ± 4.1 <sup>a</sup>	23.50 ± 2.2 <sup>b</sup>	34.24 ± 1.1 <sup>a</sup>	—	—	—	—	—	—	
乙醇	—	2.13 ± 0.2 <sup>b</sup>	7.50 ± 0.5 <sup>a</sup>	3.56 ± 1.1 <sup>b</sup>	12.88 ± 1.2 <sup>a</sup>	30.22 ± 3.7 <sup>a</sup>	30.45 ± 1.5 <sup>a</sup>	8.27 ± 0.6 <sup>b</sup>	11.50 ± 3.5 <sup>a</sup>	7.17 ± 0.7 <sup>b</sup>	12.55 ± 0.5 <sup>a</sup>	—	—	—	—	—	—	
丙醇	53 952.63	6.32 ± 0.9 <sup>b</sup>	8.21 ± 0.4 <sup>a</sup>	12.40 ± 1.2 <sup>a</sup>	11.04 ± 1.1 <sup>b</sup>	3.46 ± 1.2 <sup>a</sup>	3.96 ± 1.7 <sup>a</sup>	7.37 ± 0.6 <sup>b</sup>	47.50 ± 2.6 <sup>a</sup>	10.80 ± 0.8 <sup>a</sup>	4.82 ± 0.7 <sup>b</sup>	<1	<1	<1	<1	<1	<1	
己酸	2 517.16	4.73 ± 1.0 <sup>b</sup>	8.64 ± 1.1 <sup>a</sup>	6.08 ± 0.9 <sup>b</sup>	13.79 ± 1.7 <sup>a</sup>	10.29 ± 2.0 <sup>b</sup>	16.60 ± 1.6 <sup>a</sup>	28.30 ± 2.1 <sup>b</sup>	47.90 ± 2.1 <sup>a</sup>	14.90 ± 4.2 <sup>b</sup>	14.80 ± 0.7 <sup>a</sup>	<1	<1	<1	<1	<1	<1	
乙酸	—	2.34 ± 0.7 <sup>b</sup>	4.38 ± 2.0 <sup>a</sup>	3.56 ± 0.5 <sup>a</sup>	4.26 ± 0.6 <sup>a</sup>	19.70 ± 2.5 <sup>b</sup>	156.20 ± 8.3 <sup>a</sup>	15.60 ± 2.7 <sup>b</sup>	74.60 ± 1.5 <sup>a</sup>	34.50 ± 3.5 <sup>b</sup>	88.60 ± 3.6 <sup>a</sup>	—	—	—	—	—	—	
己酸乙酯	55.33	256.10 ± 14 <sup>b</sup>	342.60 ± 12.0 <sup>b</sup>	328.00 ± 12.1 <sup>b</sup>	714.80 ± 12.8 <sup>a</sup>	565.70 ± 7.0 <sup>b</sup>	777.02 ± 7.5 <sup>a</sup>	368.35 ± 8.9 <sup>b</sup>	1681.00 ± 11.1 <sup>a</sup>	114.54 ± 6.7 <sup>b</sup>	856.10 ± 4.00 <sup>a</sup>	20.7	154.72	—	—	—	—	
乙酸异戊酯	93.93	263.92 ± 11 <sup>a</sup>	143.70 ± 8.3 <sup>b</sup>	176.50 ± 10.0 <sup>b</sup>	186.77 ± 4.0 <sup>a</sup>	149.04 ± 6.1 <sup>a</sup>	84.75 ± 1.1 <sup>b</sup>	152.62 ± 4.5 <sup>b</sup>	186.60 ± 5.8 <sup>a</sup>	171.80 ± 6.2 <sup>b</sup>	186.98 ± 7.0 <sup>a</sup>	18.29	19.89	—	—	—	—	
乙酸苯乙酯	—	64.26 ± 9.16	78.90 ± 5.7 <sup>a</sup>	113.70 ± 4.1 <sup>a</sup>	102.66 ± 4.9 <sup>b</sup>	359.31 ± 10.9 <sup>a</sup>	281.02 ± 6.5 <sup>b</sup>	103.85 ± 5.6 <sup>b</sup>	152.13 ± 4 <sup>a</sup>	142.71 ± 6.0 <sup>b</sup>	197.90 ± 2.6 <sup>a</sup>	—	—	—	—	—	—	
十六酸乙酯	—	17.25 ± 1.9 <sup>b</sup>	46.70 ± 7.5 <sup>a</sup>	23.57 ± 2.2 <sup>b</sup>	72.82 ± 3.9 <sup>a</sup>	49.11 ± 3.7 <sup>a</sup>	42.41 ± 2.2 <sup>a</sup>	193.98 ± 11.0 <sup>b</sup>	142.40 ± 5.3 <sup>b</sup>	0.03 ± 0.1 <sup>b</sup>	167.53 ± 8.9 <sup>a</sup>	—	—	—	—	—	—	
乙酸异丁酯	—	2.41 ± 0.7 <sup>a</sup>	3.57 ± 1.0 <sup>a</sup>	2.98 ± 1.0 <sup>b</sup>	6.97 ± 0.1 <sup>a</sup>	8.23 ± 2.4 <sup>b</sup>	20.84 ± 2.8 <sup>a</sup>	11.24 ± 3.4 <sup>b</sup>	86.62 ± 5.6 <sup>a</sup>	16.01 ± 1.7 <sup>b</sup>	57.26 ± 7.5 <sup>a</sup>	—	—	—	—	—	—	
L-乳酸乙酯	—	13.40 ± 1.2 <sup>b</sup>	15.84 ± 2.2 <sup>a</sup>	20.56 ± 2.3 <sup>b</sup>	27.16 ± 4.1 <sup>a</sup>	28.02 ± 1.7 <sup>b</sup>	110.60 ± 5.9 <sup>a</sup>	28.11 ± 1.2 <sup>b</sup>	63.06 ± 2.6 <sup>a</sup>	44.26 ± 2.0 <sup>b</sup>	160.10 ± 13.0 <sup>a</sup>	—	—	—	—	—	—	
辛酸乙酯	12.87	12.89 ± 1.8 <sup>a</sup>	13.40 ± 1.9 <sup>a</sup>	14.48 ± 1.8 <sup>a</sup>	16.48 ± 1.8 <sup>a</sup>	45.69 ± 2.1 <sup>b</sup>	75.35 ± 1.2 <sup>a</sup>	88.13 ± 14.9 <sup>b</sup>	503.10 ± 6.0 <sup>a</sup>	30.43 ± 3.2 <sup>b</sup>	75.33 ± 9.9 <sup>a</sup>	23.64	58.53	—	—	—	—	
庚酸乙酯	1 122.3	9.82 ± 0.7 <sup>a</sup>	10.11 ± 0.8 <sup>a</sup>	15.79 ± 1.6 <sup>a</sup>	11.31 ± 1.1 <sup>b</sup>	26.72 ± 4.1 <sup>a</sup>	22.28 ± 2.4 <sup>b</sup>	85.15 ± 9.9 <sup>a</sup>	16.10 ± 1.86 <sup>b</sup>	20.09 ± 2.8 <sup>a</sup>	4.41 ± 0.5 <sup>b</sup>	<1	<1	<1	<1	<1	<1	
戊酸乙酯	26.78	10.38 ± 0.5 <sup>a</sup>	8.40 ± 0.7 <sup>a</sup>	13.8 ± 2.30 <sup>a</sup>	4.90 ± 1.2 <sup>b</sup>	13.80 ± 1.7 <sup>a</sup>	8.66 ± 1.3 <sup>b</sup>	21.91 ± 5.9 <sup>a</sup>	7.61 ± 0.53 <sup>b</sup>	15.47 ± 3.4 <sup>b</sup>	12.68 ± 1.5 <sup>a</sup>	5.77	4.73	—	—	—	—	

注:表中数据后下方不同小写字母表示两组间具有显著性差异( $P<0.05$ );—表示未查到阈值。

表 2 细菌的 Alpha 多样性统计分析结果

Table 2 Results of statistical analysis of Alpha diversity of bacteria

组别	sobs	shannon	simpson	chao	coverage/%
a	49.40 ± 2.70	1.26 ± 0.50	0.45 ± 0.23	56.29 ± 4.73	99.97
b	55.80 ± 14.00	1.69 ± 0.18	0.25 ± 0.06	60.60 ± 13.06	99.90

ter)、乳球菌属 (*Lactococcus*)、假单孢菌属 (*Pseudomonas*)、小球菌属 (*Pediococcus*)、无色杆菌属 (*Achromobacter*)、不动细菌属 (*Acinetobacter*)、红球菌属 (*Rhodococcus*)、肠杆菌属 (*Enterobacter*)、未注释到的乳酸乳球目微生物 (*unclassified-o-Lactobacillales*)、代尔夫特菌属 (*Delftia*)、芽孢杆菌属 (*Bacillus*)。由图 2c 可看出, a、b 两组的乳酸菌属 (*Lactobacillus*) 丰度均在发酵第 5~15 天时增加, 15~20 d 时下降, 在发酵 20~25 d 时又逐渐增加, 两组变化趋势一致。a 组中的魏斯氏菌属 (*Weissella*) 发酵初期时丰度较高达到 79.95%, 随着发酵的进行丰度逐渐降低, 直到发酵中后期时升高, 发酵后期时又下降到 5.5%; b 组魏斯氏菌属

(*Weissella*) 发酵初期时丰度为 56.06%, 显著低于 a 组, 在发酵 5~10 d 时下降至 7.86%, 发酵后期丰度较为稳定; b 组中的小球菌属 (*Pediococcus*) 从发酵初期至发酵结束, 丰度皆高于 a 组。魏斯氏菌属 (*Weissella*)、乳球菌属 (*Lactococcus*)、小球菌属 (*Pediococcus*) 都属于乳酸菌, 乳酸菌在发酵过程中产生乳酸、乙酸等有机酸, 直接影响最终酒体风味<sup>[25]</sup>。乳酸、乙酸等有机酸在发酵前阶段由乳酸菌迅速产生, 降低了发酵系统的 pH 值, 从而抑制了各种杂菌的生长, 而代谢产生的二氧化碳则有助于维持发酵系统的厌氧环境, 为后期乳酸菌的生长创造有利的环境<sup>[26]</sup>。这些有机酸也是白酒中重要风味的前体物质, 乳酸菌在白酒发酵过程中通

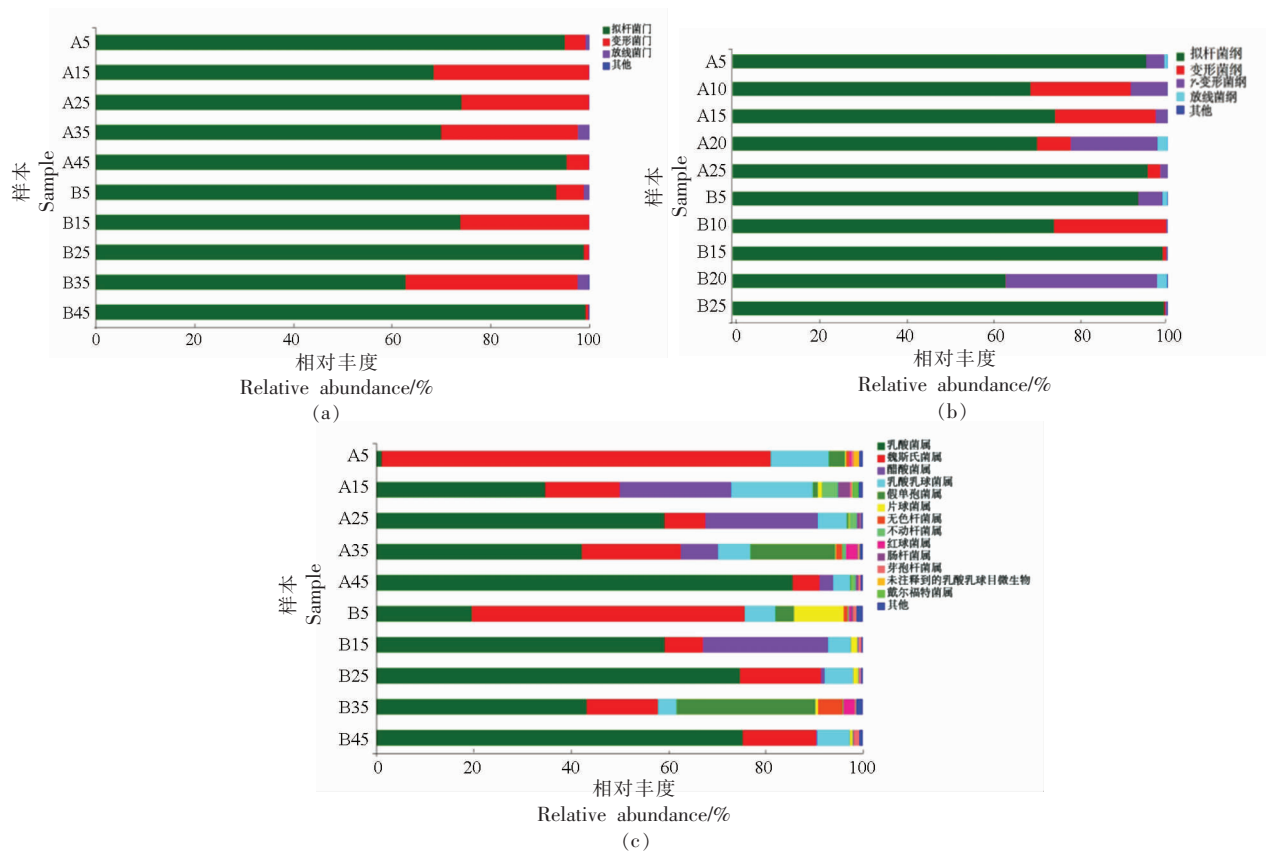


图 2 样品细菌门(a)、纲(b)和属(c)水平物种组成分析

Fig.2 Proportion of bacterial abundance on phylum (a), class (b) and genus (c) level

过代谢有机酸、竞争营养成分可以抑制其它微生物的生长,从而调节了发酵过程的微生物群落结构,维持酿酒微生态的环境,间接影响酒体的品质<sup>[27]</sup>。醋杆菌属(*Acetobacter*)能够氧化葡萄糖或乙醇生成乙酸,也是乙醇代谢的主要来源。假单胞菌属(*Pseudomonas*)是清香型白酒酒醅中常见的细菌<sup>[28]</sup>,a、b两组中的该菌属在发酵5~15 d时丰度持续下降,在第20天时均到达最大值,分别是17.48%,28.57%,异常威客汉姆酵母 Y-1 菌株的添加,对假单胞菌属在后期繁殖有一定促进作用,根据文献报道<sup>[29-30]</sup>,假单胞菌属(*Pseudomonas*)能够代谢酶水解淀粉、蛋白质等,产生丁酸、己酸等风味前体物。a、b两组中的芽孢杆菌属(*Bacillus*)丰度在发酵5~20 d时,一直呈下降趋势直至在发酵结束时才有所增长,最终b组的芽孢杆菌属丰度略高于a组,芽孢杆菌属在白酒中也拥有重要地位,在白酒某些风味物质合成中起着至关重要的作用,比如吡嗪类、部分高级醇。a组中不动细菌属(*Acinetobacter*)、肠杆菌属(*Enterobacter*)的丰度都是发酵初期增长,中后期下降,而b组从发酵初期至发酵结束,一直呈下降趋势。不动细菌属(*Acinetobacter*)<sup>[31]</sup>是具有发酵代谢的细菌,是白酒酒醅中主要的微生物,肠杆菌属(*Enterobacter*)<sup>[30]</sup>可产生纤维素酶和乳酸,对白酒风味的形成也具有重要贡献。总而言之,添加异常威客汉姆酵母 Y-1 菌株使白酒酒醅中的细菌菌群结构发生了明显的改变,是使酒醅风味改变的关键所在。

#### 2.4 酒醅细菌菌群与酒醅主要代谢物质的相关性分析

对a、b两组细菌群落和酒醅中几种主要的代谢物质进行RDA分析。将酒醅中的几种主要物质视为环境因子,通过RDA来揭示微生物群落组成与白酒风味之间可能存在的关系,结果如图3所示。总体上,这两个轴解释了原核群落分化的61.68%,说明细菌群落与这几种主要代谢物质之间存在很强的相关性。

a、b两组细菌菌群和酒醅酯类物质之间相关性分析中,对酒醅丰度前30的细菌菌群与酒醅中酯类物质的相关性分析如图4所示,发现己酸乙酯、L-(-)乳酸乙酯、乙酸异戊酯、苯乙醇、异戊醇、己酸等多种风味物质的含量与微生物存在相关

性,比如醋杆菌属(*Acetobacter*)、芽孢杆菌属(*Bacillus*)、明串珠菌属(*Leuconostoc*)、肠球菌属(*Enterococcus*)、未注释到的乳酸乳球目微生物(*unclassified\_o\_Lactobacillales*)、克罗彭施泰特氏菌(*Kroppenstedtia*)等。己酸乙酯含量与醋杆菌属(*Acetobacter*)呈显著正相关,与乳酸菌属(*Lactobacillus*)、肠球菌属(*Enterococcus*)丰度呈正相关,与明串珠菌属(*Leuconostoc*)丰度呈显著负相关。L-(-)乳酸乙酯含量与与乳酸菌属(*Lactobacillus*)呈显著正相关,乙酸异戊酯含量与芽孢杆菌属

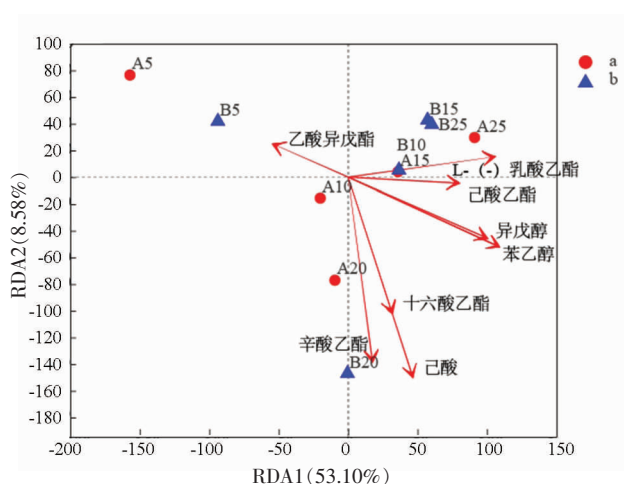
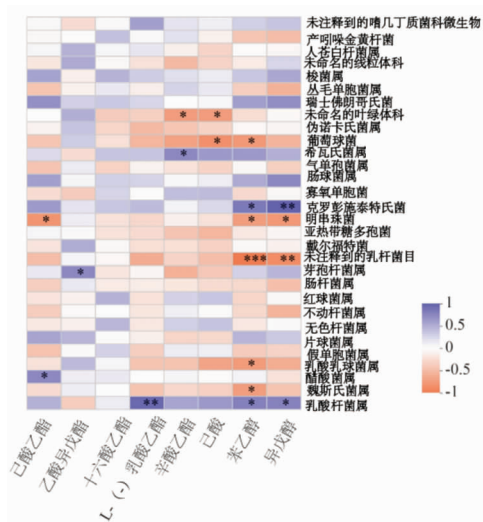


图3 酒醅中细菌与部分代谢物质的RDA分析  
Fig.3 RDA analysis of bacteria and some metabolites in fermented grains



注:\* $0.01 < P \leq 0.05$ ; \*\* $0.001 < P \leq 0.01$ ; \*\*\* $P \leq 0.001$ 。

图4 酒醅中部分代谢物与细菌群落的相关性热图分析  
Fig.4 Correlation heat map analysis of some metabolites in fermented grains and bacterial communities

(*Bacillus*)呈显著正相关,辛酸乙酯含量与希瓦菌属(*Shewanella*)呈显著正相关。苯乙醇、异戊醇的含量与乳酸菌属(*Lactobacillus*)、克罗彭施泰特氏菌(*Kroppenstedtia*)丰度呈显著正相关,与明串珠菌属(*Leuconostoc*)丰度呈显著负相关。

## 2.5 酒醅真菌群落 Alpha 多样性分析

对 10 个样本真菌的 18S rRNA V3-V4 区进

行高通量测序,经统计,样品序列数为 397 598,平均序列长度 380 bp。两组样本 Alpha 多样性汇总如表 3 所示。由表 3 可看出,b 组仅 simpson 指数大于 a 组,说明该酵母的添加,对发酵过程中酒醅真菌菌落的多样性和丰富度没有明显提升。coverage 指数分别为 99.97%,99.90%,说明本次测序结果可以代表样品中微生物真实情况。

表 3 真菌的 Alpha 多样性统计分析结果

组别	sobs	shannon	simpson	chao	coverage/%
a	8.60 ± 1.14	0.61 ± 0.35	0.63 ± 0.22	8.97 ± 1.33	99.99
b	8.40 ± 2.30	0.38 ± 0.32	0.80 ± 0.18	8.50 ± 2.12	99.99

## 2.6 酒醅真菌群落物种组成

经 OTU 注释,两组样品中共检测出 3 个可鉴定门,如图 5a,分别为子囊菌门(Ascomycota)、被孢霉门(Mucoromycota)、担子菌门(Basidiomycota),两组的优势菌门(相对丰度大于 1%)均为子囊菌门(Ascomycota)。在纲水平上,两组共检测出 6 个可鉴定纲,如图 5b 所示。其中 a 组优势纲(相对丰度大于 1%)为半子囊菌纲(Saccharomycetes),b 组优势纲为半子囊菌纲(Saccharomycetes)、粪壳菌纲(Sordariomycetes),两组存在一定差异。

在属水平上,共鉴定出 11 个可鉴定属,如图 5c 分别为未注释到的酵母科微生物(*unclassified\_f\_\_ Saccharomycetaceae*)、毕赤酵母属(*Pichia*)、未命名的肉座菌目微生物(*norank\_o\_\_Hypocreales*)、假丝酵母属(*Candida-Lodderomyces\_clade*)、地霉属(*Geotrichum*)、镰刀菌属(*Fusarium*)、曲霉属(*Aspergillus*)、未命名的毛霉门微生物(*norank\_p\_\_Mucoromycota*)、*Apiotrichum*、威客汉姆属(*Wickerhamomyces\_Candida\_clade*)、未注释到的伞菌纲微生物(*unclassified\_c\_\_Agaricomycetes*)。

其中 a 组的优势属(相对丰度大于 1%)为未注释到的酵母科微生物(*unclassified\_f\_\_ Saccharomycetaceae*)、毕赤酵母属(*Pichia*)、假丝酵母属(*Candida-Lodderomyces\_clade*),b 组的优势属为未注释到的酵母科微生物(*unclassified\_f\_\_ Saccharomycetaceae*)、毕赤酵母属(*Pichia*)、未命名的

肉座菌目微生物(*norank\_o\_\_Hypocreales*)。两组在发酵 5~10 d 时,毕赤酵母属(*Pichia*)丰度有明显增加,增至 a 组 23.76%,b 组 41.65%,而在发酵中后期(15~25 d 时),a 组又开始减少,在后期时又少量增加,而 b 组在发酵中后期时,变化较为稳定,发酵结束时丰度为 75.05%。毕赤酵母属具有较强的产酯能力,在白酒酿造中常用来改善白酒风味及品质。b 组中的假丝酵母属(*Candida-Lodderomyces\_clade*)相较 a 组丰度较高,假丝酵母在发酵过程中产生脂肪酶,是合成白酒中多种酯类物质的关键,能够间接影响白酒最终品质。

## 2.7 酒醅真菌群落与酒醅主要代谢物质的相关性分析

通过 RDA 来揭示真菌群落组成与酒醅中主要代谢物之间可能存在的关系,结果如图 6 所示。总体上,这两个轴解释了真菌群落的 99.85%,其中 a 组样本基本聚集在第一象限,b 组样本基本聚集在第二象限,说明 a、b 两组微生物组成明显不同。同时,两轴对整个真菌群落的解释度较高,说明这几种物质与真菌群落的组成十分相关。a、b 两组真菌菌群和酒醅主要物质之间相关性分析如图 7 所示。发现己酸乙酯、L-(-)乳酸乙酯、辛酸乙酯、苯乙醇、异戊醇的含量均与毕赤酵母属(*Pichia*)丰度呈显著正相关,除此之外,己酸乙酯含量还与假丝酵母属(*Candida-Lodderomyces\_clade*)、地霉属(*Geotrichum*)丰度呈显著正相关,苯乙醇、异戊醇两个醇类的含量与威客

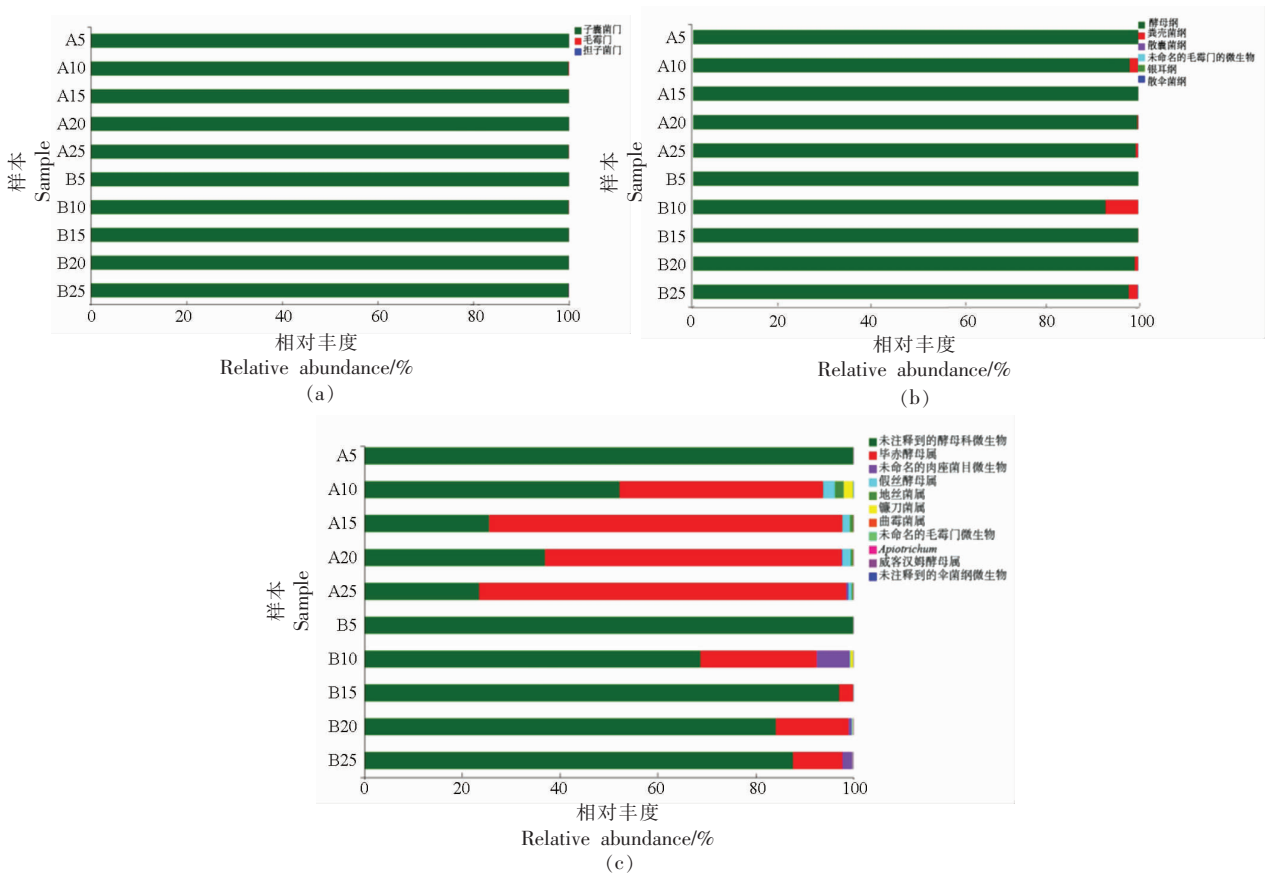


图5 样品真菌门(a)、纲(b)和属(c)水平物种组成分析

Fig.5 Proportion of fungal abundance on phylum (a), class (b) and genus (c) level

汉姆属(*Wickerhamomyces-Candida\_clade*)丰度呈显著负相关。己酸乙酯、辛酸乙酯、己酸等多个风味物质的含量均与假丝酵母属 (*Candida- Lod-*

*deromyces\_clade*)丰度呈显著正相关。毕赤酵母属 (*Pichia*)产酯能力强,假丝酵母属发酵过程中能够产生脂肪酶,是合成多种风味成分的关键。

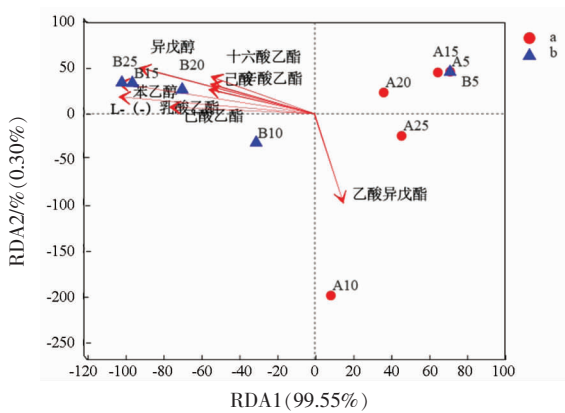


图6 酒醅中真菌与部分代谢物质的 RDA 分析

Fig.6 RDA analysis of fungi and some metabolites in fermented grains

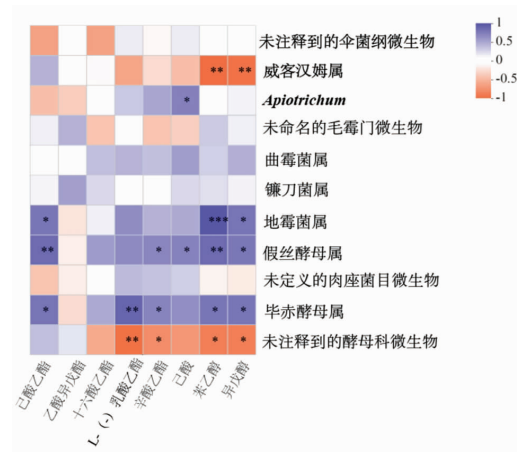


图7 酒醅中部分代谢物与真菌群落的相关性热图分析

Fig.7 Correlation heatmap analysis of some metabolites in fermented grains and fungal communities

### 3 结论

本试验分析了添加异常威客汉姆酵母对白酒固态发酵中的主要代谢物质变化和微生物群落结构的影响。结果表明:人工添加异常威客汉姆酵母可以对白酒风味有一定改善作用,除它本身的产酯能力外,添加该酵母所引起的微生物群落结构的变化对风味改善至关重要。通过高通量测序技术分析两组酒醅细菌、真菌的微生物菌群结构,发现a、b两组酒醅中优势菌属不同。并通过分析菌群和主要代谢物质的相关性发现己酸乙酯含量与醋杆菌属(*Acetobacter*)丰度呈显著正相关,与乳酸菌属(*Lactobacillus*)、肠球菌属(*Enterococcus*)丰度呈正相关,与明串珠菌属(*Leuconostoc*)丰度呈显著负相关。其中b组的假丝酵母属(*Candida - Lodderomyces\_ clade*)、毕赤酵母属(*Pichia*)丰度高于a组,这两种菌属都具有较强的产酯能力,是合成己酸乙酯、十六酸乙酯等酯类物质的关键。试验结果表明异常威客汉姆酵母 Y-1 具备提升固态发酵白酒风味物质的潜力,但尚需要在实际生产中做进一步的验证研究。

### 参 考 文 献

- [1] 蒋燕明,叶成玉,陈家豪,等. 酿造微生物对白酒风味影响的研究进展[J]. 酿酒, 2021, 48(6): 10-15.  
JIANG Y M, YE C Y, CHEN J H, et al. Research progress on the effect of brewing microorganisms on liquor flavor[J]. Brewing Wine, 2021, 48(6): 10-15.
- [2] 王世伟,王卿惠,芦利军,等. 白酒酿造微生物多样性、酶系与风味物质形成的研究进展[J]. 农业生物技术学报, 2017, 25(12): 2038-2051.  
WANG S W, WANG Q H, LU L J, et al. Research progress on microbial diversity, enzyme system and flavor formation of liquor brewing[J]. Journal of Agricultural Biotechnology, 2017, 25(12): 2038-2051.
- [3] 沈怡方. 白酒风味质量形成的主要因素[J]. 酿酒科技, 2005(11): 19-23.  
SHEN Y F. The main factors of forming liquor flavor quality[J]. Brewing Technology, 2005(11): 19-23.
- [4] 石馨,惠明,田青,等. 异常威客汉姆酵母产酯酶培养基优化及发酵液香气物质分析[J]. 发酵科技通讯, 2021, 50(3): 149-155.  
SHI X, HUI M, TIAN Q, et al. Optimization of esterase production medium and analysis of aroma substances in fermentation broth of *Wickerhamomyces anomalus* [J]. Fermentation Technology Bulletin, 2021, 50(3): 149-155.
- [5] 明红梅,周健,陈蒙恩,等. 大曲中异常威客汉姆酵母发酵产苯乙醇的条件优化[J]. 湖北农业科学, 2015, 54(14): 3492-3496.  
MING H M, ZHOU J, CHEN M E, et al. Optimization of fermentation conditions for phenylethanol with abnormal Wickham yeast in Daqu[J]. Hubei Agricultural Sciences, 2015, 54(14): 3492-3496.
- [6] 刘晓柱,黎华,李银凤,等. 接种异常威客汉姆酵母对空心李果酒理化特性及香气组分的影响[J]. 食品科技, 2020, 45(11): 21-27.  
LIU X Z, LI H, LI Y F, et al. Effects of *Wickerhamomyces anomalus* inoculation on physicochemical properties and aroma components of hollow plum fruit wine[J]. Food Science and Technology, 2020, 45(11): 21-27.
- [7] 邓杰,黄治国,卫春会,等. 基于高通量测序的浓香型白酒窖池细菌群落结构分析[J]. 现代食品科技, 2015, 31(7): 50-55.  
DENG J, HUANG Z G, WEI C H, et al. Analysis of bacterial community structure in Luzhou-flavor white wine cellar based on high-throughput sequencing[J]. Modern Food Science and Technology, 2015, 31(7): 50-55.
- [8] BOKULICH N A, MILLS D A. Next-generation approaches to the microbial ecology of food fermentations[J]. Bmb Reports, 2012, 45(7): 377.
- [9] 张明珠,吴学风,穆冬冬,等. 基于高通量测序的窖泥原核微生物群落结构及其理化因子相关性分析[J]. 食品科学, 2021, 42(18): 111-118.  
ZHANG M Z, WU X F, MU D D, et al. Analysis of prokaryotic microbial community structure and its Physicochemical factors based on high-throughput sequencing[J]. Journal of Food Science, 2021, 42(18): 111-118.
- [10] WANG W, FAN G S, LI X T, et al. Application of *Wickerhamomyces anomalus* in simulated solid-state fermentation for Baijiu production: Changes of



- microbial community structure and flavor metabolism [J]. *Frontiers in Microbiology*, 2020, 11: 598758.
- [11] 戴奕杰, 李宗军, 田志强. 酱香型白酒大曲和酒醅的细菌多样性分析[J]. *食品科学*, 2019, 40(4): 152-159.
- DAI Y J, LI Z J, TIAN Z Q. Bacterial diversity analysis of soy sauce liquor Daqu and fermented grains[J]. *Food Science*, 2019, 40(4): 152-159.
- [12] 江伟, 韦杰, 李宝生, 等. 不同原料酿造单粮白酒风味物质特异性分析[J]. *食品科学*, 2020, 41(14): 234-238.
- JIANG W, WEI J, LI B S, et al. Specificity analysis of flavor substances in single grain liquor brewed with different raw materials[J]. *Food Science*, 2020, 41(14): 234-238.
- [13] 朱克永, 胡继红, 方燕. 白酒挥发成分测定的研究[J]. *食品研究与开发*, 2015, 36(21): 146-149.
- ZHU K Y, HU J H, FANG Y. Study on determination of volatile components in liquor[J]. *Food Research and Development*, 2015, 36(21): 146-149.
- [14] 戴奕杰, 李宗军, 田志强. 酱香型白酒大曲和酒醅的真菌多样性分析[J]. *现代食品科技*, 2018, 34(7): 97-104.
- DAI Y J, LI Z J, TIAN Z Q. Analysis of fungal diversity of soy sauce liquor Daqu and fermented grains[J]. *Modern Food Science and Technology*, 2018, 34(7): 97-104.
- [15] CHEN S F, ZHOU Y Q, CHEN Y, et al. fastp: an ultra-fast all-in-one FASTQ preprocessor [J]. *Bioinformatics*, 2018, 34(17): 884-890.
- [16] MAGO T, SALZBERG S L. FLASH: Fast length adjustment of short reads to improve genome assemblies[J]. *Bioinformatics*, 2011, 27(21): 2957-2963.
- [17] EDGAR R C. UPARSE: highly accurate OTU sequences from microbial amplicon reads [J]. *Nature Methods*, 2013, 10(10): 996-998.
- [18] STACKEBRANDT E, GOEBEL B M. Taxonomic note: A place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology[J]. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 1994, 44(4): 846-849.
- [19] WANG Q. Naive Bayesian classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy[J]. *Appl Environ Microbiol*, 2007, 73(16): 5261-5267.
- [20] HONG L X, FU G M, CHEN Y R, et al. Functional microbial agents enhance ethanol contents and regulate the volatile compounds in Chinese Baijiu[J]. *Food Bioscience*, 2021, 44(PA): 101411.
- [21] 孙宝国, 黄明泉, 王娟. 白酒风味化学与健康功效研究进展[J]. *中国食品学报*, 2021, 21(5): 1-13.
- SUN B G, HUANG M Q, WANG J. Research progress of liquor flavor chemistry and health effect [J]. *Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology*, 2021, 21(5): 1-13.
- [22] 赵慧君, 胡事成, 张振东, 等. 基于电子鼻和 GC-MS 技术对山东成武和广西英家大头菜挥发性物质分析[J]. *中国调味品*, 2021, 46(7): 11-16.
- ZHAO H J, HU S C, ZHANG Z D, et al. Analysis of volatile compounds in Shandong Chengwu and Guangxi Yingjia Kohlrabi based on electronic nose and GC-MS[J]. *Chinese Condiments*, 2021, 46(7): 11-16.
- [23] 应静. 浓香型酒新发酵模式的酒醅微生物群落和代谢产物研究[D]. 贵阳: 贵州大学, 2019.
- YING J. Study on microbial communities and metabolites of fermented grains in new fermentation mode of Luzhou-flavor wine[D]. Guiyang: Guizhou University, 2019.
- [24] 游玲, 王松, 冯瑞章, 等. 宜宾产区浓香型白酒窖房空气、窖泥和糟醅可培养细菌的相关性[J]. *食品科学*, 2012, 33(9): 188-192.
- YOU L, WANG S, FENG R Z, et al. Correlation of culpable bacteria in the cellar room air, cellar mud and fermented grains of strong flavor white wine from Yibin producing area[J]. *Food Science*, 2012, 33(9): 188-192.
- [25] 李慧敏, 林凤, 王玉梅, 等. 武宣地区红曲米对红曲柿酒品质影响及其细菌组成分析[J]. *中国酿造*, 2020, 39(10): 130-135.
- LI H M, LIN F, WANG Y M, et al. Effect of red koji rice on the quality of red koji persimmon wine in Wuxuan region and analysis of its bacterial composition[J]. *China Brewing*, 2020, 39(10): 130-135.
- [26] 邢敏钰. 芝麻香型白酒发酵过程中乳酸菌群结构及功能[D]. 无锡: 江南大学, 2017.
- XING M Y. Structure and function of lactic acid bacteria in the fermentation process of sesame flavor liquor[D]. Wuxi: Jiangnan University, 2017.
- [27] WANG H Y, GAO Y B, FAN Q W, et al. Characterization and comparison of microbial community of different typical Chinese liquor Daqus by PCR-

- DGGE[J]. *Letters in Applied Microbiology*, 2011, 53(2): 134-140.
- [28] 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分析[J]. *食品科学*, 2020, 41(8): 130-138.
- HU X X, HUANG Y G, JIANG X, et al. Analysis of bacterial community structure diversity in fermented soybean sauce liquor pottery[J]. *Food Science*, 2020, 41(8): 130-138.
- [29] 王海燕. PCR-DGGE 技术对清香型汾酒微生物群落结构演变规律的研究[D]. 无锡: 江南大学, 2014.
- WANG H Y. Study on the evolution law of microbial community structure of Fenjiu by PCR-DGGE [D]. Wuxi: Jiangnan University, 2014.
- [30] 黄春凯, 左小明, 王红蕾, 等. 一株产纤维素酶菌株的分离、鉴定及产酶特性[J]. *微生物学通报*, 2015, 42(4): 646-653.
- HUANG C K, ZUO X M, WANG H L, et al. Isolation, identification and enzyme-producing characteristics of a cellulase-producing strain[J]. *Chinese Journal of Microbiology*, 2015, 42(4): 646-653.
- [31] 韩兴林, 潘学森, 尚柯, 等. 酱香高温堆积酒醅中原核微生物构成的分析[J]. *酿酒*, 2017, 44(1): 22-27.
- HAN X L, PAN X S, SHANG K, et al. Analysis on composition of protonuclear microorganisms in fermented grains of soy sauce at high temperature [J]. *Brewing Wine*, 2017, 44(1): 22-27.

## Effects of Enhanced *Wickerhamomyces anomalus* on Microbial Structure and Ester Synthesis in Liquor Brewing

Shi Xin<sup>1</sup>, Hui Ming<sup>1,2\*</sup>, Tian Qing<sup>1</sup>, Wang Hongzhao<sup>3</sup>

<sup>1</sup>*School of Bioengineering, Henan University of Technology, Zhengzhou 450001*

<sup>2</sup>*Industrial Microbial Culture Preservation and Breeding Henan Engineering Research Center, Zhengzhou 450001*

<sup>3</sup>*Henan Yupo Liquor Co., Ltd., Zhumadian 463900, Henan*

**Abstract** *Wickerhamomyces anomalus* is conducive to the synthesis of ester compounds in liquor brewing. Esters are important flavor substances of liquor, and their types and contents play a vital role in liquor quality. In this experiment, simulated solid-state fermentation technology was used to study the mechanism of improving liquor flavor substances by artificially adding *W. anomalus* in liquor production. The fermentation experiment was divided into two groups: the blank group (a) and the addition of *W. anomalus* Y-1 (b). GC-MS analysis of fermented grains samples from different fermentation periods showed that the addition of Y-1 strain could significantly increase the content of esters and other flavor substances in fermented grains samples. The content of ethyl caproate, the main ester of Luzhou-flavor liquor in group b, was significantly higher than that in group a ( $P < 0.05$ ). The content of ethyl caproate in group b was  $(856.1 \pm 4.00)$  mg/L at 25 days of fermentation. High-throughput sequencing was performed on the two groups of fermented grains during the fermentation process. The results of Alpha diversity showed that the diversity and richness of bacterial community in group b were higher than those in group a, while the diversity and abundance of fungi were similar, but the abundance of each genus was different. Therefore, the bioaugmentation of liquor fermentation by *W. anomalus* can change the content of ethyl acetate and other flavor substances. This change is mainly caused by the change of microbial structure caused by the addition of *W. anomalus*. The results suggest that *W. anomalus* Y-1 has the potential to improve the flavor profile of solid-state fermented liquor.

**Keywords** *Wickerhamomyces anomalus*; liquor solid state fermentation; biofortification; high-throughput sequencing