

黄酒机械成型麦曲制曲过程中真菌动态变化的研究

陈建尧¹, 曹 钰¹, 谢广发², 陆 健^{1,3}

1(江南大学工业生物技术教育部重点实验室, 江苏 无锡, 214122)

2(浙江古越龙山绍兴酒股份有限公司, 浙江 绍兴, 312000)

3(江南大学 生物工程学院, 江苏 无锡, 214122)

摘 要 采用传统分离培养和免培养的方法研究了机械化黄酒麦曲堆放成型过程中真菌群落的动态变化情况。研究结果显示, 机械化黄酒麦曲堆放成型过程中演替存在的真菌大致分 13 个属, 其中犁头霉属、曲霉属、毛霉属真菌存在于整个麦曲成型堆放过程中。在麦曲成型堆放的前期, 麦曲中主要存在犁头霉属(*Absidia corymbifera*)、曲霉属(*Aspergillus oryzae*)、毛霉属(*Rhizomucor Pusillus*)、青霉属(*Penicillium aurantiogriseum*)、毕赤酵母属(*Pichia burtonii*)等真菌。在麦曲成型堆放的中后期, 除前期存在的真菌外, 还存在裸胞壳属(*Emericella nidulans*)、散囊菌属(*Eurotium amstelodami*)、青霉属(*Penicillium chrysogenum*)、棒孢酵母属(*Clavispora lusitaniae*)、毕赤酵母属(*Pichia anomala*)、伊萨酵母属(*Issatchenkia orientali*)、平脐蠕孢属(*Bipolaris spiciifera*)和复膜孢酵母属(*Saccharomycopsis fibuligera*)。反映出机械化黄酒麦曲在成型堆放过程中真菌多样性丰富, 这些真菌微生物在麦曲品质和黄酒大罐酿造中均有重要的影响。

关键词 黄酒麦曲, 真菌, RISA, 进化树分析

麦曲在绍兴黄酒的酿造过程中起着极重要的作用, 其用量约为原料糯米的 1/6, 不但是黄酒酿造的粗酶制剂, 而且麦曲内蓄积多种微生物的代谢产物, 赋予了黄酒独特的风味。麦曲可分为生麦曲(块曲)和熟麦曲, 在绍兴黄酒酿造中, 生麦曲仍占主导地位。生麦曲生产原采用脚踏成型, 由于劳动强度大, 劳动生产率低, 近年来开始推广采用压块机成型。前期的研究发现, 在固态培养体系中真菌混合培养时的酶系远复杂于单一真菌培养产酶之和。这一结果明确了在麦曲成型堆放过程中参与演替的真菌有哪些, 有哪些真菌对麦曲中多酶体系的形成有贡献, 这是十分必要的。

通常对微生物群落结构的研究可采用分离培养鉴定等传统方法, 随着微生物分子生态学技术的发展, 还可以避开纯培养, 通过分析环境样品中 DNA 分子的种类和数量来反映微生物区系组成和群落结构。目前该技术已广泛应用于发酵类食品微生物群落结构及变化情况, 如分析威士忌在发酵过程中微生物的多样性变化情况^[1]; 研究白酒糟醅中对白酒特殊风味起重要作用的真菌和细菌群落结构^[2,3]; 此外还运用于其他一些发酵产品, 如镇江香醋^[4]、越南米酒^[5]等。RISA(Ribosomal Intergenic Spacer Analy-

sis)技术因其低成本、分析快速等优点首次用于分析土壤群落结构^[6]。目前, RISA 指纹分析技术已经应用于污水处理系统的微生物功能评价^[7]、地下水细菌群落结构差异性比较^[8]、酿造车间环境微生物评估^[9]、黄酒成品麦曲的真菌多样性研究^[10]等。

本研究针对黄酒麦曲机械化成型堆放过程中真菌微生物的动态变化, 结合分离培养鉴定方法和 RISA 图谱分析技术, 来初步研究真菌群落在麦曲固态发酵过程中的动态变化规律, 为进一步解析麦曲中演替存在的真菌群落及其与产酶的功能关系奠定基础。

1 材料和方法

1.1 黄酒麦曲采集

机械化黄酒麦曲采自绍兴某黄酒厂, 分别采集了黄酒麦曲成型堆放过程中第 0, 1, 2, 3, 4, 5, 7, 10, 13, 17, 19, 21, 25 天样品, 所有样品均低温保藏并且及时处理。

1.2 黄酒麦曲基本指标测定

机械化黄酒麦曲水分及品温的测定, 机械化黄酒麦曲糖化酶及酸性蛋白酶活力测定见文献^[13,14]。

1.3 麦曲样品真菌微生物分离

采用察氏培养基(Czapek)分离麦曲样品中的真菌微生物, 培养基中添加 150 mg/L 链霉素以及脱氧胆酸钠, 分别用于抑制细菌生长和抑制菌丝蔓延, 对分离的纯种真菌接种于土豆培养基斜面 4℃ 冰箱保

第一作者: 硕士研究生(陆健为通讯作者)。

收稿日期: 2008-01-31

存。

1.4 麦曲样品基因组 DNA 提取及 PCR 扩增

取粉碎麦曲混匀样品 10 g,放入含 90 mL 0.5% NaCl 无菌稀释液中,150 r/min 振荡 1 h,4 层纱布过滤后于 10 000 r/min 下离心 10 min,菌体沉淀收集于 7 mL 无菌离心管中 4 °C 冰箱保存备用。

分离的纯种真菌接种于 100 mL 无菌土豆培养基中 30 °C,200 r/min 培养 2 d,真空抽滤收集菌丝体,用超纯水洗涤菌体后保存于 7 mL 离心管中。

对离心收集的菌体采用朱衡等氯化苄法^[15]提取真菌基因组 DNA,采用苯酚-氯仿纯化抽提的基因组 DNA,-20 °C 保存备用。

真菌基因组 DNA 采用真菌通用引物 ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') 和 ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') 扩增真菌 ITS 区域。PCR 反应中含 1 μL 模板 DNA,引物各 0.5 μmol/L, dNTP 200 μmol/L, 1.5 mmol/L MgCl₂, 5 μL 10× PCR buffer, 2.5 U Taq polymerase, 最终反应体积为 50 μL。PCR 反应程序为 94 °C 预热 5 min, (94 °C 1 min, 52 °C 1 min, 72 °C 1 min) 共 30 个循环, 72 °C 10 min。取 PCR 产物 5 μL 于 1.2% 的琼脂糖凝胶上电泳, EB 染色后检测 PCR 扩增结果。

1.5 PAGE 凝胶电泳及序列测定

PCR 产物经 5% PAGE 电泳 10 h, 电泳结束后用 EB 染色 15 min 于凝胶成像系统中拍照保存。对 RISA 指纹图谱中发生明显变化的条带, 用无菌小刀切割下来放入 2 mL 离心管中, 捣碎后加入洗脱缓冲液 (0.5 mol/L NH₄Ac, 10 mmol/L Tris-HCl pH 8.0, 1 mmol/L EDTA pH 8.0), 37 °C 洗脱过夜, 离心收集上清液 1 μL 作模板, 按照 ITS-PCR 的扩增程序扩增, 将扩增产物经过 PCR 产物纯化试剂盒纯化 (从上海博彩生物科技有限公司购买), 用 T4 DNA 连接酶与 pUCm-T 载体 16 °C 连接过夜, 然后热激转化入 *E. coli* JM109 感受态细胞。以氨苄青霉素 (终浓度 100 mg/L) 抗性和蓝白斑筛选克隆子, 通过 PCR 确定阳性克隆, 送样到上海生工生物工程有限公司测序。

纯株的 PCR 产物通过 PCR 产物纯化试剂盒纯化后由上海生工生物工程有限公司测序。

1.6 系统发育分析及相应登录号

测序结果提交 GenBank 数据库, 利用 Blastn 软件进行序列比对, 获得与所得序列相似性程度最高的菌株。采用 Clustal X 软件 (ver1.8) 对所测得的菌株

序列进行多重序列比对, 比对完成后用 Mega (ver3.1) 中的邻接法 (N-J) 构建系统发育树。本研究获得的 ITS 序列提交 GenBank 数据库, 获得的登录号为 EU409803-EU409812 (纯株 FH1-FH10) 和 EU409795-EU409802 (Band1-Band8)。

2 结果

2.1 黄酒麦曲成型堆放过程中基本指标测定

机械化黄酒麦曲一般是在每年 7~8 月制作, 跟踪测定了机械化黄酒麦曲在成型堆放过程中水分含量及品温的变化, 结果见图 1。

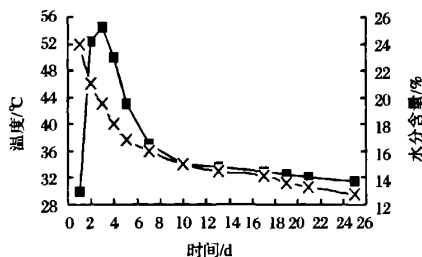


图1 黄酒麦曲在制作堆放过程中水分含量及品温的变化

从图 1 看出, 麦曲水分含量在加压成型时为 24.0%, 随后麦曲堆放在曲房中, 受曲房环境温/湿度的影响, 麦曲中水分含量逐渐下降, 在麦曲成型堆放第 1 周后, 麦曲水分含量下降到了 16.0%, 水分蒸发较快, 1W 之后麦曲水分含量下降变慢, 在麦曲成型堆放结束时麦曲中水分含量接近于成品麦曲, 为 12.8%。

小麦经轧碎拌水成型后送入曲房, 及时的关窗措施造成相对封闭的环境, 随着麦曲水分的逐步蒸发及麦曲中所含微生物的生理代谢开始活跃, 麦曲品温迅速增加, 在麦曲成型堆放的第 3 天, 达到了麦曲中的最高品温, 为 54.5 °C。此后在开窗等降温措施下, 麦曲品温逐渐回落。在曲块成型堆放的第 1 周, 麦曲品温一直维持在 37 °C 以上, 此后麦曲品温逐渐回落, 在麦曲制作结束时, 麦曲品温接近室温, 为 31.5 °C。机械化黄酒麦曲在成型堆放过程中的水分及品温, 为麦曲中真菌微生物的生长及代谢产酶提供了条件。

机械化黄酒麦曲约占大罐黄酒发酵投料米的 16% 左右, 在黄酒发酵过程中主要起糖化发酵酶制剂的作用, 此外麦曲中酸性蛋白酶对形成黄酒特殊风味前驱物质也有重要作用。跟踪测定了机械化黄酒麦曲在成型堆放过程中糖化酶及酸性蛋白酶的变化情

况,见图2。

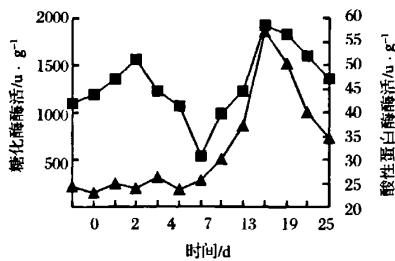


图2 黄酒麦曲在制作堆放过程中糖化酶及酸性蛋白酶酶活变化曲线

从图2看出,黄酒麦曲在成型堆放过程中2种酶活力经历了3个阶段,第1阶段为麦曲成型堆放过程的第1周,在这段时间里,糖化酶活力先增加后降低,其中第3天糖化酶活力达到了第1阶段的最高值,为1560 U/g(干曲),在第7天时麦曲中糖化酶活力降至麦曲成型堆放过程中的最低值,仅为531 U/g(干

曲),在这阶段麦曲酸性蛋白酶活力变化不大,维持在25 U/g(干曲)左右;进入第2阶段,麦曲中糖化酶和酸性蛋白酶活力均升高,其中糖化酶活力在第17天时达到了整个麦曲成型堆放过程的最高值,为1927 U/g(干曲),酸性蛋白酶活力在第17天时为57 U/g(干曲),分别为第7天酶活力的3.63倍和2.24倍;在麦曲成型堆放的最后1周时间内,麦曲中2种酶活力均有所下降,其中糖化酶下降了29.4%,在第25天时为1361 U/g(干曲),酸性蛋白酶下降了40.3%,在第25天时为34.5 U/g(干曲)。

2.2 机械化黄酒麦曲真菌的传统分离培养和鉴定

对机械化黄酒麦曲采用平板分离培养,根据菌落在察氏培养基上的形态和颜色不同,分别进行挑菌并计算每种菌株在各样品中的菌落数,来估算黄酒麦曲样品中每种真菌的相对含量。根据菌落大小、形态和颜色等表型特征进行初步筛选和分离纯化,共获得10株纯种菌株,结果如表1所示。

表1 黄酒麦曲经不同时间堆放后所含真菌的相对含量

No.	Corresponding fungi was detected by culture-dependent method											
	1	2	3	4	5	7	10	13	17	19	21	25
FH1	+	+	++	+				+	++	++	+	
FH2		+	+	+	++	+++	++	+	+	+++	+++	++
FH3								+	+		+	+
FH4	+	+	++	++	+	+	++	+++	+++	+++	++	+
FH5						+	+	++	++	++	+	+
FH6								+	+	+		
FH7	+	++	++	+++	+++	++	+		+	++	+	
FH8	+		+	++	+	+						
FH9	+		+									
FH10	+	+		+							+	+

+, ++, +++: means that corresponding fungi appeared during the period of time considered with lower, higher and the most colonies, respectively.

-: indicates that corresponding fungi was not detected at the given growth media and conditions.

对上述10株分离自黄酒麦曲机械化成型堆放过程中纯种真菌进行ITS-PCR扩增及序列分析,通过

BLAST搜索软件在NCBI数据库中比对它们的最相似菌株,结果见表2。

表2 分离真菌的ITS测序结果及其与GenBank中参比序列的相似性

No.	ITS fragments(bp)	Cloest relative	Identification(%)	Accession Number
FH1	568bp	<i>Sporidiobolus pararoseus</i>	99	EU409803
FH2	737bp	<i>Absidia corymbifera</i>	97	EU409804
FH3	532bp	<i>Bipolaris spicifera</i>	99	EU409805
FH4	773bp	<i>Aspergillus oryzae</i>	100	EU409806
FH5	865bp	<i>Emericella nidulans</i>	99	EU409807
FH6	521bp	<i>Eurotium amstelodami</i>	98	EU409808
FH7	564bp	<i>Rhizomucor pusillus</i>	99	EU409809
FH8	560bp	<i>Penicillium aurantiogriseum</i>	99	EU409810
FH9	577bp	<i>Syncephalastrum racemosum</i>	90	EU409811
FH10	942bp	<i>Penicillium chrysogenum</i>	98	EU409812

结合表1平板计数和表2纯种真菌的鉴定,在黄酒麦曲机械化成型堆放过程中,存在的真菌主要属于犁头霉属、曲霉属和毛霉属,随着麦曲堆放过程的进行,麦曲的真菌群落结构发生了变化。其中犁头霉属(*Absidia corymbifera*)、曲霉属(*Aspergillus oryzae*)和毛霉属(*Rhizomucor pusillus*)在整个麦曲成型堆放过程中一直存在,*Absidia corymbifera*和*Aspergillus oryzae*在麦曲成型堆放的中后期数量多于前期麦曲中分离得到的,而*Rhizomucor pusillus*则前期和中期数量多于后期中麦曲中分离得到的。

裸胞壳属(*Emericella nidulans*)在麦曲成型堆放的中后期出现,并且数量较多。锁掷酵母属(*Sporidiobolus pararoseus*)在麦曲成型堆放的前期和后期出现,但是在麦曲成型堆放的中期并没有分离到。共头霉属(*Syncephalastrum racemosum*)和青霉属(*Penicillium aurantiogriseum*、*Penicillium chrysogenum*)在麦曲成型堆放的前期出现,但是随着麦曲堆放的进行,麦曲中很少能分离得到此类真菌。*Bipolaris spiciifera*在麦曲成型堆放的中后期出现,数量并不是很多。*Eurotium amstelodami*在麦曲成型堆放的中期有所出现,但是数量并不是很多。

2.3 机械化黄酒麦曲真菌的 RISA 图谱分析和序列鉴定

对机械化黄酒麦曲直接提取基因组 DNA,采用真菌通用引物对其进行 ITS-PCR 扩增和丙烯酰胺凝胶电泳分离,如图3所示。

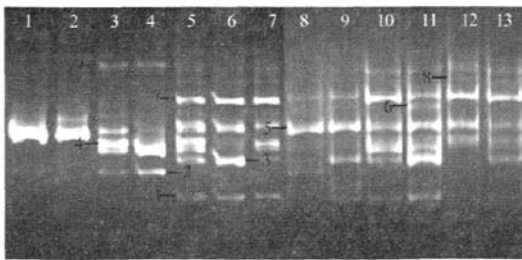


图3 麦曲成型堆放过程中不同时间点样品的 RISA 图谱

从图3看出,随着麦曲成型堆放过程的进行,麦曲中主要真菌群落出现了此消彼长的变化,较好的符合了依酶活变化划分的3个阶段。其中 Band4,5,7所代表的真菌基本存在于整个麦曲成型堆放过程中。泳道1~7为麦曲成型堆放过程的第一阶段,在这段时间里麦曲中微生物的条带数逐渐增多,其中条带5

在第一阶段一直存在,条带1和7在第一阶段的中后期出现,条带2和4在第一阶段的中间突然出现,之后又逐渐消失或减弱,在图中1000bp~1500bp,还存在着一些较弱的条带,说明微生物的数量并不是很多,但是在第一阶段的后期出现了。泳道8~10为麦曲成型堆放过程的第二阶段,在这阶段条带1,5,7存在于整个阶段,而条带4在第一阶段的后期减弱,在第二阶段条带又出现,条带3在第二阶段的中后期出现,亮度上有所加强。泳道11~13为麦曲成型堆放过程的第三阶段,在这阶段麦曲中微生物基本处于稳定状态,条带1,4,5,7存在于整个阶段,条带3和6出现逐渐减弱的趋势,条带8处在800bp以上,在麦曲成型堆放的末期一直存在。

麦曲成型堆放过程的 RISA 图谱,只能反映相应麦曲中数量占优势真菌的变化情况,而不能全面反映麦曲中所有真菌的变化情况。有研究报道,通过分子手段研究微生物只能分析其中DNA含量>1%微生物^[16]。从图3看麦曲成型堆放过程中微生物的变化,占优势真菌的微生物在第一阶段逐渐增多,真菌在破碎小麦表面繁殖旺盛,在曲块表面布满后逐渐向曲块内部生长,在麦曲成型堆放过程结束时麦曲中所含的优势真菌逐渐稳定。

对 RISA 图谱的主要条带胶回收测序,测序结果见表3。从测序结果看出,麦曲成型堆放过程中主要的真菌微生物属于曲霉属、毛霉属、犁头霉属及一些酵母。结合图3中条带的大小分布,麦曲成型堆放过程第1阶段出现的微生物属于曲霉属,犁头霉属,毛霉属,毕赤酵母属,伊萨酵母属,棒孢酵母属(*Clavispora lusitaniae*);到了第2阶段,麦曲中真菌微生物属于曲霉属,犁头霉属,毛霉属,棒孢酵母属;到了第3阶段,麦曲中真菌微生物又演变成曲霉属,犁头霉属,毛霉属,毕赤酵母属。曲霉属、毛霉属和犁头霉属真菌在整个麦曲成型堆放过程中一直存在。

2.4 黄酒麦曲机械化成型堆放过程中麦曲真菌群落分析

将通过免培养法和培养法得到的所有序列通过邻接法构建的系统发育树如图4所示。从图4看出,麦曲成型堆放过程中的真菌微生物分13属15种,分别为犁头霉属、曲霉属、毛霉属、裸胞壳属、锁掷酵母属、共头霉属、青霉属、散囊菌属、伊萨酵母属、棒孢酵母属、毕赤酵母属、平脐蠕孢属和复膜袍酵母属。反映出机械化黄酒麦曲在成型堆放过程中真菌多样性非常丰富,这些真菌微生物在麦曲成型堆放及黄酒大

罐酿造中起着重要的作用。

表 3 RISA 图谱各条带对应的真菌 ITS 测序结果及其与 GenBank 中参比序列的相似性

No.	ITS fragments(bp)	Cloest relative (species)	Identification (%)	Accession Number
1	367	<i>Clavispora lusitaniae</i>	100	EU409795
2	399	<i>Pichia burtonii</i>	99	EU409796
3	485	<i>Issatchenkia orientali</i>	99	EU409797
4	588	<i>Rhizomucor Pusillus</i>	99	EU409798
5	600	<i>Aspergillus oryzae</i>	100	EU409799
6	631	<i>Saccharomycopsis fibuligera</i>	99	EU409780
7	737	<i>Absidia corymbifera</i>	97	EU409781
8	802	<i>Pichia anomala</i>	99	EU409782
9	Not determined			

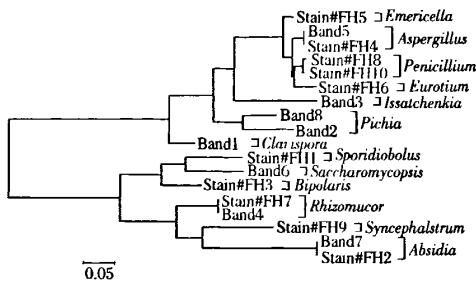


图 4 机械化黄酒麦曲通过免培养和培养法获得的真菌 ITS 序列系统进化树

机械化黄酒麦曲通过网罗环境及原料中所含有的微生物,在麦曲成型堆放的过程中各种微生物群落不断的演变更替,最终制得适合黄酒酿造的麦曲。通过分离培养和免培养相结合的方法研究机械化黄酒麦曲在成型堆放过程中真菌微生物的变化情况,发现在麦曲成型堆放的前期,麦曲中主要存在 *Absidia corymbifera*、*Aspergillus oryzae*、*Rhizomucor pusillus*、*Penicillium aurantiogriseum*、*Sporidiobolus pararoseus*,传统的观点认为是由小麦、水及其他一些环境因子等带入的。随着堆放过程的进行,进入中后期,麦曲中主要存在 *Absidia corymbifera*、*Aspergillus oryzae*、*Rhizomucor pusillus*、*Sporidiobolus pararoseus*、*Emericella nidulans*、*Eurotium amstelodami*,这与成品麦曲中存在的真菌群落基本一致^[11]。

曲霉属真菌目前广泛应用于固态发酵产糖化酶研究。麦曲制作过程中微生物的产酶类似于利用曲霉属真菌固态发酵产糖化酶的过程。麦曲成型堆放过程中环境温度在 30℃ 以上,再加上应挤压破碎而裸露的小麦胚乳更有利于曲霉孢子的萌发及菌丝的生长,从而在块状麦曲成型堆放过程中产糖化酶。目前糖化酶活力的高低是衡量麦曲质量的一个重要指标,也是影响出酒率的关键因素。在麦曲成型堆放的中后期,因曲霉属真菌(Band 5/FH5)的繁殖旺盛,

致使麦曲中糖化酶活力直线上升,在第 17 天时最高,达到了 1 927.3 U/g(干曲),虽然在成型堆放后期糖化酶活力有所降低,但仍为 1 361 U/g(干曲),为黄酒发酵过程糖化大米淀粉等物质提供保障。从黄酒麦曲中分离得到的曲霉属 *Aspergillus oryzae* Ao-01 在优化的培养条件下产糖化酶高达 1 645 U/g(干曲)^[2]。

采用 2 种分析方法获得的研究结果总体上基本一致,但也存在一些细小的差异。对于存在于麦曲整个成型堆放过程的真菌及在麦曲成型堆放中后期出现的真菌 2 种方法都能较好的反映,但是 2 种方法之间均有对方未检测出的真菌存在,说明在研究像黄酒麦曲等复杂微生物体系时有必要采用多种方法。

3 讨论

机械化黄酒麦曲中含有丰富的微生物资源,通过网罗自然界中丰富的微生物,在破碎小麦中生长繁殖,产生各种代谢产物。采用低营养度的察氏培养基低温长时间培养,较好的分离了麦曲中所含有的真菌微生物资源,有资料显示,低营养度的培养基更接近微生物生长的自然状态,更有利于微生物的生长,而低温长时间的培养也有利于那些生长缓慢的微生物生长成肉眼可见的菌落^[9]。

本研究同时采用 RISA 图谱技术研究黄酒麦曲成型堆放过程中真菌微生物多样性情况,从 RISA 图谱上可以看出,黄酒麦曲机械化成型堆放的早期,麦曲中真菌微生物种类和数量并不是很多,随着堆放过程的进行,麦曲中真菌微生物逐渐丰富,进入麦曲堆放的后期优势真菌群逐渐稳定。

随着黄酒产业的迅速发展,麦曲这一半成品生产由于受到场地和生产季节及周期的限制,越来越影响到黄酒的规模化生产发展。这就促使人们尝试进

行多方面的工艺调整,如加大高糖化酶活的熟麦曲的使用比例,或是采用现代酶制剂逐步取代生熟麦曲。然而黄酒本身是风味产品,上述调整尚欠缺理论上的指导。本研究对黄酒麦曲机械化成型堆放过程中演替存在的真菌群落开展研究,系统发育分析显示麦曲成型堆放过程中的微生物大致可以分为 13 个属,分别为犁头霉属、曲霉属、毛霉属、裸胞壳属、锁掷酵母属、共头霉属、青霉属、散囊菌属、伊萨酵母属、棒孢酵母属、毕赤酵母属、平脐蠕孢属和复膜孢酵母属。而这些微生物在黄酒大罐酿造中的功能如何,正在研究之中。

参 考 文 献

- 1 Sylvie van Beek, Fergus G. Priest. Evolution of the Lactic Acid Bacterial Community during Malt Whisky Fermentation: a Polyphasic Study[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2002, 68(1): 297~305
- 2 张文学, 向文良. 浓香型白酒窖池糟醅原核微生物区系的分类研究[J]. 酿酒科技, 2005, 13(7): 22~25
- 3 张文学, 乔宗伟. 浓香型白酒糟醅中真菌菌群的多样性分析[J]. 四川大学学报(工程科学版), 2006, 38(5): 97~101
- 4 许伟, 张晓君. 镇江香醋醋酸发酵过程中细菌群落组成成分分析[J]. 微生物学通报, 2007, 34(4): 646~649
- 5 Dung N T P, Rombouts F M. Functionality of selected strains of moulds and yeasts from Vietnamese rice wine starters[J]. Food Microbiology, 2006, 23: 331~340
- 6 Satchanska G, Kanmming K. Molecular bacterial diversity in soil and waters of two East German uraniummining waste piles[J]. Bacterial-metal/radaio Nuclide Interaction, 1999, 252(1): 96~98
- 7 秦华明, 梁世中. RISA 法对生物强化处理油脂废水的效应评估[J]. 生物技术, 2007, 48(3): 48~51
- 8 田扬捷, 杨虹. 用 RISA 法评估地下水细菌群落结构差异及变化[J]. 微生物学报, 2004, 44(5): 676~678
- 9 Asako Takeuchi, I Kazumaru Iijima. Application of Ribotyping and rDNA Internal Space Analysis(RISA) for Assessment of Microflora in Brewery Environments[J]. J Am Soc Brew Chem, 2005, 63(2): 73~75
- 10 Guang-fa Xie, Wang-jun Li, Jian Lu. Isolation and identification of representative fungi from Shaoxing rice wine wheat Qu using polyphasic approach of culture-based and molecular-based methods[J]. The journal of the Institute of Brewing, 2007, 113(3): 272~279

Dynamic Analysis of Fungal Communities in Wheat Qu-machine Making Process Revealed by Culture-dependent and Molecular Approaches

Chen Jianyao¹, Cao Yu¹, Xie Guangfa², Lu Jian^{1,3}

1(The Key Laboratory of Industrial Biotechnology Ministry of Education, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

2(Zhejiang Guyue Longshan Shaoxing Wine Co. Ltd. Shaoxing 312030, China)

3(School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

ABSTRACT The fungal community of Qu-Making process was investigated by using an approach combining fungal isolation with culture media and RISA fingerprint of total community DNA with specific primers. The results revealed that representative fungi of Qu-Making process were *Absidia corymbifera*, *Aspergillus oryzae*, *Rhizomucor pusillus*, *Emericella nidulans*, *Sporidiobolus pararoseus*, *Syncephalastrum racemosum*, *Penicillium aurantiogriseum*, *Penicillium chrysogenum*, *Penicillium aurantiogriseum*, *Issatchenkia orientali*, *Clavispora lusitaniae*, *Pichia anomala*, *Pichia burtonii*, *Bipolaris spiciifera* as well as *Saccharomycopsis fibuligera* species. Species of *Absidia corymbifera*, *Aspergillus oryzae* and *Rhizomucor pusillus* were detected throughout the process, and were considered not only the original communities but also the dominant communities during the stack of Qu-Making. Besides the species that were found throughout the entire process, *Penicillium aurantiogriseum* and *Pichia burtonii* were existent in the prophase of Qu-Making process. *Emericella nidulans*, *Pichia anomala*, *Issatchenkia orientali*, *Penicillium aurantiogriseum*, *Penicillium chrysogenum*, *Clavispora lusitaniae*, *Saccharomycopsis fibuligera*, *Bipolaris spiciifera* existed in the later Qu-making process. The results obtained clearly revealed that wheat Qu of mechanization were rich in microorganism, which played an important role in the formation of the characteristics of final wheat Qu and Chinese rice wine brewery.

Key words rice wine wheat Qu, fungi, RISA, phylogentic analysis