DOI:10.12441/spyswjs.20231031003 [文章编号] 1673-1689(2025)02-0090-11

高温大曲放线菌的筛选及特性解析

杨少娟 赵雯宇 黄河鸥 谢 丹 尹延顺 杨军林 吴 成 胡建锋 尤小龙 汪地强*

(贵州习酒股份有限公司,贵州 遵义 564622)

摘要:【目的】从高温大曲中分离和筛选放线菌(*Actinomycetes*),解析其功能特性,以期为酿造环境中放线菌资源的开发与利用提供理论依据。**【方法】**采用平板稀释涂布法从高温大曲中筛选放线菌,并进行形态学和分子生物学鉴定;采用高效液相色谱、气相色谱检测菌株的代谢产物,并运用Illumina测序技术对菌株的全基因组进行测序。**【结果】**筛选到一株能水解淀粉的放线菌XJ-DQ-B-0001,鉴定为芬克纤维微菌(*Cellulosimicrobium funkei*)。代谢产物检测结果表明,菌株代谢可产生乳酸、乙酸、*β*-苯乙醇、乙酸乙酯等14种代谢产物。基因组测序结果表明,菌株基因组全长3 043 158 bp,GC占比74.57%,共预测到2 769个编码基因;对基因的功能注释分析发现,菌株具有代谢产生碳水化合物水解酶、风味物质和潜在健康因子的潜力。**【结论】**通过解析菌株XJ-DQ-B-0001的功能特性,发现放线菌能代谢产生对酿造白酒有益的水解酶、风味物质和健康因子,为酿造环境中放线菌资源的开发与利用提供了数据支撑。

关键词:高温大曲;放线菌;代谢产物;全基因组测序

Screening and Characteristic Analysis of *Actinomycetes* in High-temperature Daqu

*YANG Shaojuan ZHAO Wenyu HUANG Heou XIE Dan YIN Yanshun YANG Junlin WU Cheng HU Jianfeng YOU Xiaolong WANG Diqiang**

(Guizhou Xijiu Co., Ltd., Zunyi 564622, China)

Abstract: [**Objective**] To provide a theoretical basis for the development and utilization of *Actinomycetes* resources in Baijiu-making environment, *Actinomycetes* were isolated and screened from high-temperature Daqu, and their functional characteristics were analyzed. [**Method**] *Actinomycetes* were screened from high-temperature Daqu using the dilution-plate coating method, and identified based on morphological characteristics and molecular biological evidence. Specifically, the metabolites of the strain were detected by high performance liquid chromatography and gas chromatography, and the Illumina platform was used for whole genome sequencing of the strain. [**Result**] The starch-degrading strain XJ-DQ-B-0001 was identified as *Cellulosimicrobium funkei*. The results of metabolite detection showed that strain XJ-DQ-B-0001 produced 14 metabolites, including lactic acid, acetic acid, *β*-phenyl ethanol, and ethyl acetate. The genome of strain XJ-DQ-B-0001 was 3 043 158 bp in length, with a GC percentage of 74.57% and 2 769 predicted protein-coding genes. The functional annotation of genes showed that the strain had the potential to produce carbohydrate hydrolases, flavor substances, and potential health factors. [**Conclusion**] The functional characterization of strain XJ-DQ-B-0001 shows that *Actinomycetes* can produce hydrolases, flavor substances, and health factors, which are beneficial to Baijiu brewing. The findings provide data support for the development and utilization of *Actinomycetes* resources in the Baijiu-producing environment.

Keywords: high-temperature Daqu; *Actinomycetes*; metabolites; whole genome sequencing

基金项目:贵州省科技支撑计划项目(黔科合支撑[2023]一般342号,黔科合支撑[2023]一般343号);贵州省工业和信息化2023年储备资金项目(黔财工[2021]46号)。

通信作者:汪地强(1976—),男,博士,研究员,主要从事白酒酿造与风味研究。E-mail:diqiangwang@163.com

收稿日期:2023-10-31 **修回日期:**2023-12-03

酱香型白酒因深厚的文化底蕴、独特的“12987”酿造工艺、极具特色的酒体风味，深受广大消费者喜爱[1-2]，其中高温大曲为酱香型白酒的酿造提供了独特的酿造微生物、丰富的酿酒酶系和风味前体物质[3-5]，在酱香型白酒酿造中有着举足轻重的作用。高温大曲制作过程中的发酵顶温可达68 ℃，随着发酵温度的上升，大曲中不耐热的酵母菌、霉菌生长受限，细菌成为高温大曲中的优势物种[3,6]。

放线菌是高G+C含量的革兰氏阳性细菌，能够产生多种酶和大量活性显著的次级代谢产物[7]。由于放线菌（主要是链霉菌）代谢产生的土嗅素（geosmin）是白酒中的霉味物质，在痕量水平（阈值在ng/L水平）即可影响白酒的风味与品质。放线菌代谢产生的抗生素会抑制酿造酵母、霉菌的生长，减少酵母、霉菌贡献的风味物质，但目前对酿酒过程中放线菌的研究较少[8-10]。目前有关酿酒环境中放线菌的研究表明，放线菌的代谢产物不仅是白酒中重要的呈香、呈味物质，也具有生物调控作用[11-12]。因此，基于放线菌在酿酒过程中的应用潜力，需加强对放线菌资源的开发，并深入挖掘其在酿酒过程中的应用价值。

全基因组测序可获取生物体完整的基因组信息，进而从基因层面解析菌株的代谢特征及应用潜力。目前已对白酒中分离获得的链霉菌属（*Streptomyces*）、节杆菌属（*Arthrobacter*）、*Thermophilibacter*的菌株进行了全基因组测序，并解析了重要的代谢途径和功能[13]。作者从高温大曲样品中分离并筛选放线菌，解析所获得菌种的形态、生理生化、代谢产物以及基因组信息等，以期加强对酿造环境中放线菌资源的开发和利用。

1 材料与方法

1.1 仪器及试剂

扫描电子显微镜：SU8100型，日本Hitachi公司；高效液相色谱仪：1260 Infinity型，美国Agilent Technologies公司；气相色谱仪：8890型，美国Agilent Technologies公司；细菌基因组DNA试剂盒、PCR引物：生工生物工程（上海）股份有限公司；其余化学试剂均为国产分析纯。

LB固体培养基：胰蛋白胨1 g、酵母提取物0.5 g、NaCl 1 g、琼脂2 g、水100 mL，pH 7.2。

LB液体培养基：胰蛋白胨1 g、酵母提取物0.5 g、NaCl 1 g、水100 mL，pH 7.2。

1.2 样品采集

高温大曲样品采集自贵州习酒股份有限公司制曲车间。黄、白、黑3种类型的高温大曲各取3块，研磨成粉后按大曲类型分别混合均匀，将3个样品装入自封袋中于−80 ℃保存。

1.3 样品预处理及菌株分离

将大曲样品置于无菌培养皿中，80 ℃干热处理1 h。称取10 g样品置于含90 mL无菌水的三角烧瓶中，于30 ℃、180 r/min振荡处理30 min，用无菌水按照1×10^{-4}、1×10^{-5}稀释，然后吸取100 μL样品稀释液涂布于LB固体培养基上，37 ℃倒置培养7 d，培养期间根据菌落形态挑取单菌落接种至LB固体培养基上。纯化后的菌株用体积分数20%甘油管于−80 ℃保存。

1.4 菌株鉴定

1.4.1 形态鉴定

将分离的菌株接种到LB固体培养基上，37 ℃倒置培养48 h后，观察菌落的形态特征，挑取单菌落制片进行革兰氏染色镜检，同时将连带着培养基的菌落置于含体积分数2.5%戊二醛的溶液中于室温固定2 h，用扫描电子显微镜观察菌株的菌丝结构。

1.4.2 生理生化鉴定

通过温度（28、37、45、50、55、60 ℃）、pH（4.0、5.0、6.0、7.0、8.0、9.0、10.0、11.0、12.0、13.0）、NaCl质量分数（0、1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%）等耐受试验，以及过氧化氢酶、碳源利用、牛奶凝固与胨化、淀粉水解、纤维素降解、Tween-80水解等生理生化试验[14]，观察菌株的生理生化特性。

1.4.3 分子生物学鉴定

采用Ezup柱式基因组DNA试剂盒提取菌株DNA，用细菌通用引物27F（AGTTTGATCMTGGCTCAG）和1492R（GGTTACCTTGTTACGACTT）进行16S rRNA基因扩增。25 μL PCR扩增体系：模板DNA 0.5 μL、缓冲液2.5 μL、dNTP 2.5 μL、*Taq* DNA聚合酶0.2 μL、27F 0.5 μL、1492R 0.5 μL、

ddH_2O 18.3 μL。PCR 扩增程序：94 ℃预变性 4 min；94 ℃变性 45 s，55 ℃变性 45 s，72 ℃延伸 1 min，循环 30 次；72 ℃反应 10 min。扩增完成后，回收 PCR 产物并测序。测序结果在 NCBI 数据库（https://www.ncbi.nlm.nih.gov/）中比对，并采用 MEGA 7.0 软件[15]构建菌株 16S rRNA 基因序列的系统发育树，以确定菌株系统发育地位。

1.5 菌株液体发酵及代谢产物测定

1.5.1 菌株液体发酵

将菌株接种到 LB 液体培养基中，于 37 ℃、180 r/min 培养 12 h 得到种子液，然后以体积分数 1% 将种子液接种到 LB 液体培养基中，于 37 ℃、180 r/min 培养 12 h，用于代谢产物的检测。用空白的 LB 液体培养基作为对照组。

1.5.2 代谢产物测定

取 1 mL 菌液用 0.22 μm 的有机滤膜过滤除菌后，参照张宝玉等[16]的方法对发酵液中的乳酸、乙酸进行检测；取 10 mL 菌液置于容量瓶中，加入 200 μL 混合内标（叔戊醇 319.20 mg/L、乙酸正戊酯 303.20 mg/L、2-乙基丁酸 305.60 mg/L），混匀后分装至进样瓶，参照孙优兰等[17]的方法对发酵液中的色谱骨架成分进行检测。

1.6 菌株全基因组测序及数据分析

1.6.1 菌株全基因组测序

菌株接种到 LB 固体培养基上，37 ℃培养 2 d 后收集菌体送至生工生物工程（上海）股份有限公司进行全基因组测序。Illumina 测序获得的原始数据通过 Fastp[18]评估及质控后得到有效数据，采用 SPAdes 软件[19]对有效数据进行拼接，并利用 Pilon 软件[20]对拼接序列进行矫正得到组装的完整序列。

1.6.2 菌株全基因组数据分析

采用 NCBI-PGAP 预测菌株的 tRNA、rRNA、ncRNA 等基因元件。利用 NCBI Blast+将菌株的基因序列与 GO[21]、COG[22]、KEGG[23]、CAZy[24]等数据库进行比对，得到其功能注释结果。运用 CGView（http://stothard.afns.ualberta.ca/cgview_server/）绘制基因组圈图。通过 antiSMASH（https://antismash.secondarymetabolites.org/）注释，分析菌株基因组中次级代谢产物生物合成基因簇。

2 结果与讨论

2.1 菌株的筛选及鉴定

2.1.1 菌株筛选

从高温大曲中分离纯化得到 12 株菌，其中菌株 XJ-DQ-B-0001、XJ-DQ-B-0011、XJ-DQ-B-0012 革兰氏染色为阳性。对 3 株菌进行生理生化特征鉴定，发现菌株 XJ-DQ-B-0001 能水解淀粉（见图 1），具备将淀粉质原料降解为可发酵性糖的潜能，故进一步解析其功能特性。

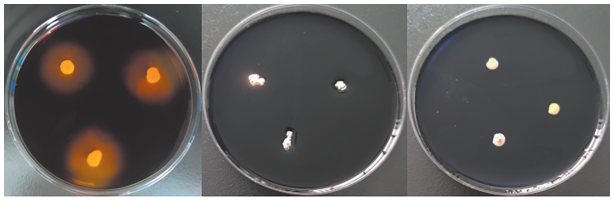


图 1 筛选具备淀粉水解能力的菌株

Fig. 1 Screening starch-hydrolyzing strains

2.1.2 形态学特征分析

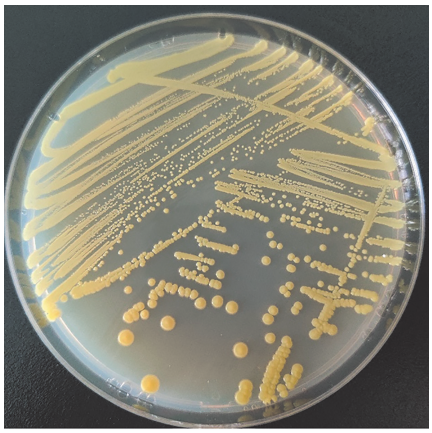
如图 2 所示，菌株 XJ-DQ-B-0001 在 LB 固体培养基上 37 ℃培养 3 d 的菌落呈现黄色、圆形、边缘整齐、表面隆起、光滑湿润，革兰氏染色为阳性，扫描电镜下观察细胞呈短杆状或球形。

2.1.3 生理生化特征分析

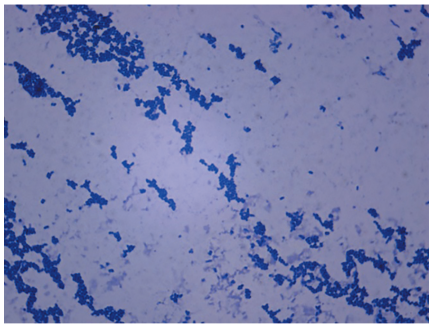
菌株生理生化试验结果见表 1。菌株 XJ-DQ-B-0001 在 28~50 ℃均能生长，pH 耐受范围为 6.0~12.0，NaCl 耐受质量分数为 0~8%。菌株的牛奶凝固与胨化、纤维素降解、Tween-80 水解结果均为阴性，过氧化氢酶、淀粉水解结果为阳性。碳源利用试验结果表明，菌株能利用蔗糖、*D*-果糖、*β*-葡聚糖、*L*-阿拉伯糖、海藻糖、乳糖、*L*-鼠李糖、低聚木糖、*D*-葡萄糖进行生长繁殖，但不能利用壳聚糖。

2.1.4 分子生物学鉴定结果

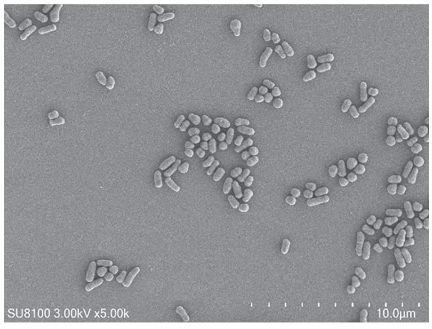
使用 NCBI 数据库（https://www.ncbi.nlm.nih.gov/）将菌株 XJ-DQ-B-0001 的 16S rRNA 基因序列与已发表菌株的序列进行对比，结果显示菌株 XJ-DQ-B-0001 与 *Cellulosimicrobium funkei* ATCC BAA-886^T 序列相似性最高，为 100%，且系统发育树（见图 3）显示菌株 XJ-DQ-B-0001 与 *Cellulosimicrobium funkei* ATCC BAA-886^T 单独聚在一个分支上。结合菌株的生理生化特征和 16S rRNA 基因分析，将菌株 XJ-DQ-B-0001 鉴定为芬克纤维微菌。



(a) LB固体培养基上的菌落形态



(b) 菌株的光学显微镜观察结果(1 000 ×)



(c) 菌株的扫描电镜观察结果(5 000 ×)

图 2　菌株 XJ-DQ-B-0001 的形态特征

Fig. 2　Morphological characteristics of strain XJ-DQ-B-0001

表 1　菌株 XJ-DQ-B-0001 的生理生化特征

Table 1　Physiological and biochemical characteristics of strain XJ-DQ-B-0001

项目	结果	项目	结果
生长温度	28~50 ℃	*D*-果糖	+
pH 耐受	6.0~12.0	*β*-葡聚糖	+
NaCl耐受质量分数	0~8%	壳聚糖	−
过氧化氢酶	+	*L*-阿拉伯糖	+
淀粉水解	+	海藻糖	++
牛奶凝固与胨化	−	乳糖	+
纤维素降解	−	*L*-鼠李糖	+
Tween-80 水解	−	低聚木糖	+
蔗糖	+	*D*-葡萄糖	+

注：“+”表示反应呈阳性；“++”表示反应呈强阳性；“−”表示反应呈阴性。

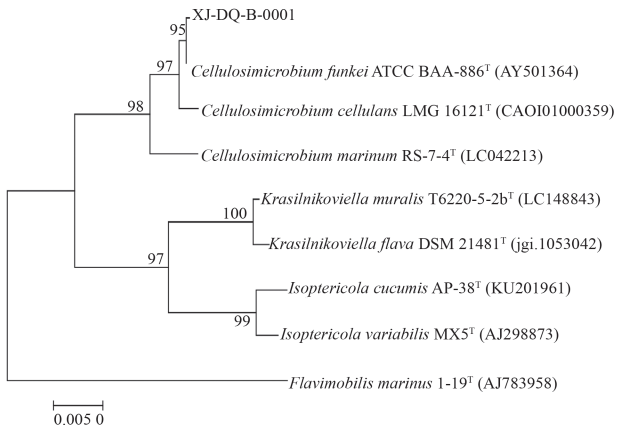


图 3　基于 16S rRNA 基因序列构建菌株 XJ-DQ-B-0001 的系统发育树

Fig. 3　Phylogenetic tree of strain XJ-DQ-B-0001 based on 16S rRNA gene sequences

2.2　菌株代谢产物分析

采用高效液相色谱仪和气相色谱仪从菌株发酵液中共检测到 18 种代谢产物（见表 2），包括 9 种有机酸、3 种醇类物质、4 种酯类物质、1 种醛类物质和 1 种酮类物质。与对照组相比，菌株发酵液中乳酸、乙酸、丙酸、丁酸、戊酸、异戊酸、庚酸的质量浓度均有一定程度的增长；就醇类物质而言，菌株发酵液中仅有 *β*-苯乙醇的质量浓度增加；就酯类物质而言，菌株发酵液中乙酸乙酯、油酸乙酯、亚油酸乙酯的质量浓度均比对照组高；就酮类物质而言，仅在菌株发酵液中检测到 3-羟基-2-丁酮，但 3-羟基-2-丁酮与 2，3-丁二醇在 2，3-丁二醇脱氢酶的作用下可以相互转化[25]，且仅在对照组中检测到 2，3-丁二醇，故推测 3-羟基-2-丁酮可能是由对照组中的 2，3-丁二醇转化而来；而对照组中的醛类物质经菌株发酵后，种类和质量浓度均明显下降，可能是由于菌株在发酵过程中将醛还原为醇或氧化为酸所致[26]。

有机酸是白酒中重要的呈味物质，也是酯类呈香物质的前体[27]；*β*-苯乙醇具有玫瑰香味，乙酸乙酯具有类似苹果的香气，两者均是白酒中重要的香气成分[28]；高级脂肪酸乙酯具有增加酒体厚重感和酒体后味的作用[29]。因此，菌株 XJ-DQ-B-0001 的代谢产物对白酒中风味物质的形成有一定促进作用。

表 2　菌株 XJ-DQ-B-0001 的代谢产物

Table 2　Metabolites of strain XJ-DQ-B-0001

分类	代谢产物	对照组代谢产物的质量浓度/（mg/L）	XJ-DQ-B-0001 组代谢产物的质量浓度/（mg/L）
有机酸	乳酸	255.09	1 402.94
	乙酸	14.88	143.78
	丙酸	4.26	6.97
	丁酸	4.20	6.08
	戊酸	—	0.94
	己酸	13.61	2.21
	异戊酸	1.45	108.82
	庚酸	—	2.14
	辛酸	12.74	11.73
	异丁酸	1.75	—
醇类	戊醇	17.21	17.68
	1,2-丙二醇	2.70	2.66
	β-苯乙醇	—	0.59
	丁醇	0.73	—
	己醇	0.24	—
	2,3-丁二醇	0.88	—
酯类	乙酸乙酯	—	7.72
	乙酸异戊酯	1.67	1.54
	油酸乙酯	11.96	17.52
	亚油酸乙酯	—	1.43
	己酸丁酯	1.79	—
醛类	乙醛	0.32	0.51
	异丁醛	0.83	—
	乙缩醛	3.50	—
	异戊醛	0.14	—
	糠醛	31.21	—
酮类	3-羟基-2-丁酮	—	1.06

注：“—”表示未检出。

2.3　菌株全基因组测序与分析

2.3.1　菌株全基因组测序与组装

对菌株 XJ-DQ-B-0001 的全基因组测序结果进行组装后，将完整的基因序列上传至 NCBI GenBank 数据库，登录号为 JAVHYN000000000。菌株 XJ-DQ-B-0001 基因组序列总长度为 3 043 158 bp，GC 占比为 74.57%，重叠群数量为 13 个，最大重叠群长度为 805 431 bp，最小重叠群长度为 793 bp，重叠群 N_{50} 为 370 574 bp，平均测序深度为 265.87 X；共预测到 2 769 个编码基因，包括 2 705 个蛋白质编码基因，以及 15 个假基因、2 个 rRNA、45 个 tRNA、2 个 ncRNA 的编码基因。图 4 为菌株 XJ-DQ-B-0001 的基因组圈图。

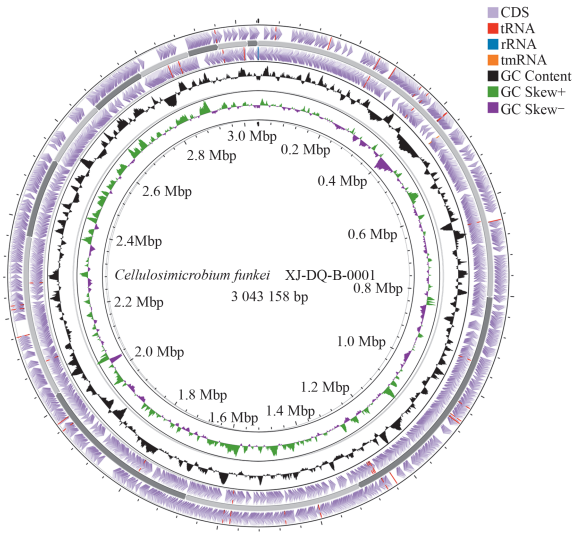


图 4　菌株 XJ-DQ-B-0001 的基因组圈图

Fig. 4　Circular graph of strain XJ-DQ-B-0001 genome

2.3.2　菌株基因组功能注释结果分析

菌株 XJ-DQ-B-0001 全基因组测序结果在 GO、COG、KEGG、CAZy 等数据库进行了功能注释，结果见图 5，在至少 1 个数据库中成功注释到 2 688 个基因，其中在 CAZy 数据库中注释到的功能基因数目最少，仅有 37 个。

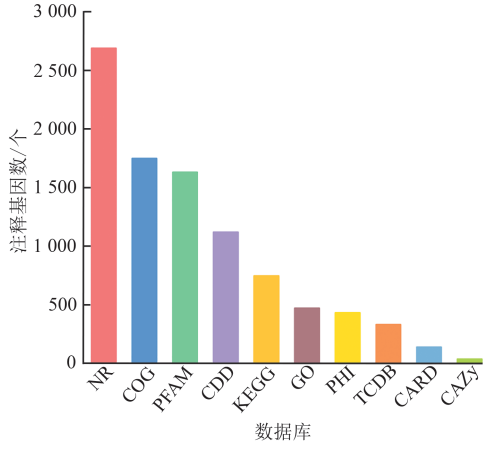


图 5　菌株 XJ-DQ-B-0001 基因组注释结果统计

Fig. 5　Statistics of annotation results of strain XJ-DQ-B-0001 genome

GO 数据库注释结果见图 6。菌株 XJ-DQ-B-0001 共有 472 个基因获得注释，占注释基因总数的 17.45%，分为 40 个 GO 亚类。其中，在分子功能大类中注释到催化活性子类的基因数目最多有 216 个，占注释基因的 45.76%；在生物学过程大类中注释到代谢过程子类的基因数目最多有 266 个，

占注释基因的56.36%。催化活性主要通过酶体现，白酒酿造过程中，酶会将酿造原料中的糖类、蛋白质、脂肪等大分子物质降解为单糖、氨基酸、脂肪酸等小分子物质，为乙醇和酒体风味物质的生成提供前体物质[30]，故推测该菌株参与了白酒的酿造。

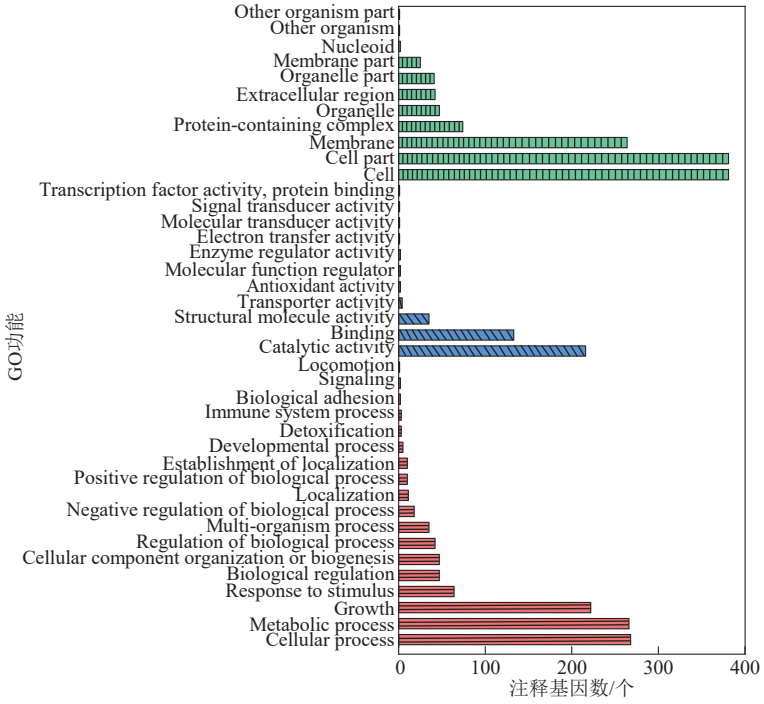


图6　菌株XJ-DQ-B-0001基因组的GO功能注释

Fig. 6　GO functional annotation of strain XJ-DQ-B-0001 genome

COG数据库的注释结果见图7。菌株XJ-DQ-B-0001中共有1 747个基因注释到23个功能分类，占注释基因总数的64.58%。其中，除一般功能预测外，注释到碳水化合物转运和代谢、氨基酸转运和代谢类别的基因数量最多，分别为177个、176个，占注释基因的10.13%、10.07%。碳水化合物、氨基酸的代谢在酿造过程中为酿酒微生物的生长繁殖提供能量，并通过生化反应生成风味物质[31-32]，故推测该菌株能在一定程度上促进白酒酿造的进程。同时，菌株XJ-DQ-B-0001基因组中存在155个功能未知的基因，可能是为了适应高温大曲制作过程的极端环境，这些基因发生了遗传变异。

KEGG数据库的注释结果见图8。菌株XJ-DQ-B-0001中共有747个基因注释到5个层级的29条通路，占基因总数的27.62%。其中，注释到代谢途径的基因数量最多，共815个；而代谢途径层级中注释到碳水化合物代谢和氨基酸代谢的基因数量最多，分别为147个、127个，表明菌株中碳水化合物和氨基酸的代谢活动较为活跃；同时，代谢途径层级有21个基因注释到萜类化后物和聚酮化合物的代谢。

进一步通过KEGG数据库代谢通路分析发现，菌株具备精氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、赖氨酸、苯丙氨酸、酪氨酸、色氨酸、丙氨酸、天冬氨酸、谷氨酸、甘氨酸、丝氨酸、苏氨酸、半胱氨酸、蛋氨酸、脯氨酸、组氨酸、氰基氨基酸这19种氨基酸的代谢途径。其中，缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸等支链氨基酸在转氨酶的作用下生成α-酮酸，再经脱羧、还原等反应分别生成异丁醇、异戊醇、活性戊醇等使酒体醇甜和具有助香功能的物质[33]；酪氨酸、苯丙氨酸等芳香族氨基酸在转氨酶作用下生成对羟基苯丙酮酸、苯丙酮酸，再经氧化、脱羧等一系列反应最终生成苯乙醇、苯乙醛、苯乙酸乙酯等风味物质[34]。

CAZy数据库的注释结果见图9。菌株XJ-

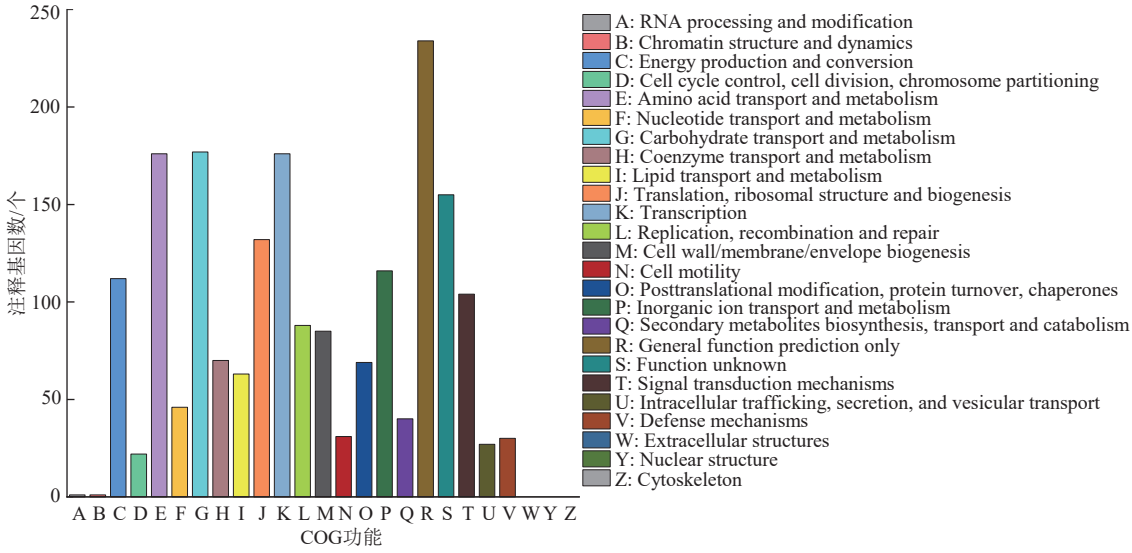


图 7　菌株 XJ-DQ-B-0001 基因组的 COG 功能注释

Fig. 7　COG functional annotation of XJ-DQ-B-0001 genome

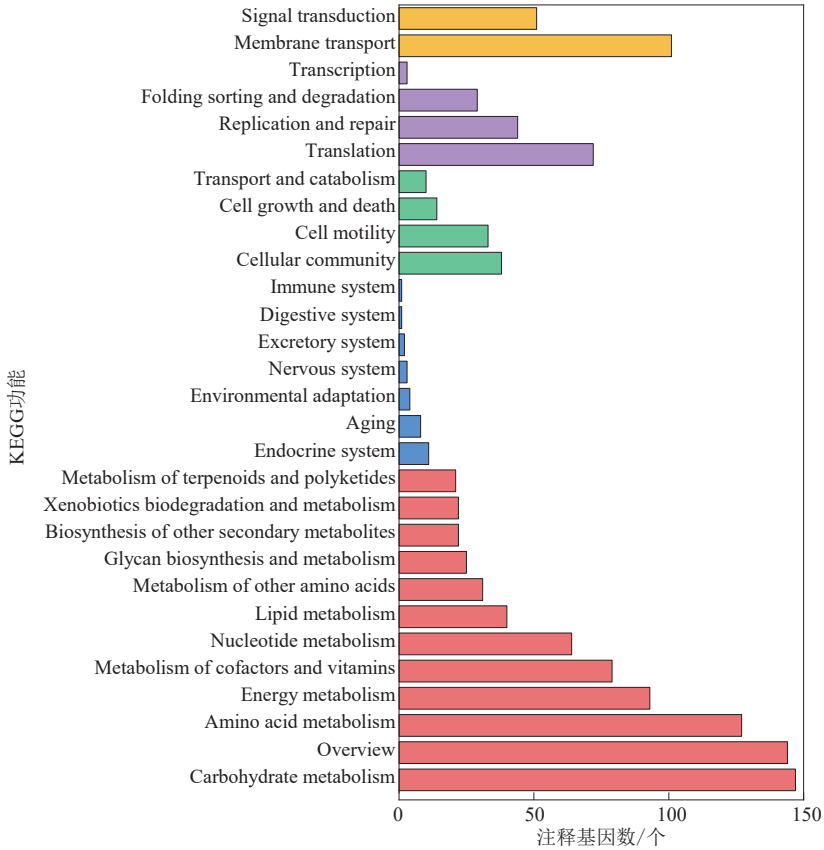


图 8　菌株 XJ-DQ-B-0001 基因组的 KEGG 功能注释

Fig. 8　KEGG functional annotation of strain XJ-DQ-B-0001 genome

DQ-B-0001 共有 37 个基因获得注释，其中糖苷水解酶（GHs）最多，有 14 个，包括 GH1、GH3、GH13、GH16、GH18、GH19、GH20、GH33、GH35、GH42、GH64、GH77、GH87、GH94；糖基转移酶（GTs）8 个，包括 GT1、GT2、GT4、GT5、GT20、GT27、GT28、GT81；辅助活性酶（AAs）3 个，包括 AA1、AA5、

AA7；碳水化合物酯酶（CEs）最少，仅注释到2个，包括CE1、CE3。

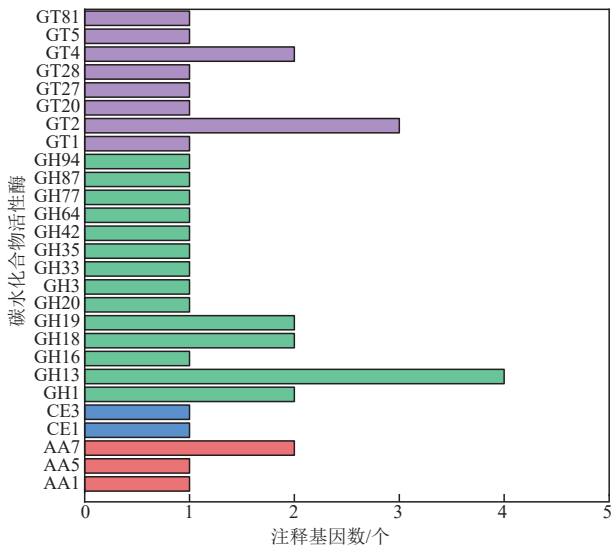


图9　菌株XJ-DQ-B-0001基因组的CAZy功能注释

Fig. 9　CAZy functional annotation of strain XJ-DQ-B-0001 genome

糖苷水解酶GH13家族中的α-淀粉酶（EC 3.2.1.1）能水解淀粉的α-1，4-糖苷键，生成可溶性直链葡聚糖和可溶性支链葡聚糖[35]，这2种葡聚糖在α-淀粉酶、异淀粉酶和β-淀粉酶的作用下水解为麦芽糖和麦芽低聚糖[36]，而麦芽糖和麦芽低聚糖则在GH13家族的α-葡萄糖苷酶（EC 3.2.1.20）的作用下进一步水解为葡萄糖[37-38]，葡萄糖被酵母吸收利用后产生乙醇和有机酸。碳水化合物酯酶CE1家族中的羧酸酯酶（CE 3.1.1.1）是一种酯酶水解酶，能非特异性地水解底物中的羧酸酯键，生成醇和羧酸[39]，起到平衡酒体中酸和酯占比，协调酒体风味的作用[40]。因此，菌株基因组中注释到的碳水化合物活性酶进一步证实了菌株XJ-DQ-B-0001具备将淀粉质原料降解为可发酵性糖的推测，同时也表明了菌株能在一定程度上促进白酒酿造的进程。

antiSMASH预测结果见表3。菌株XJ-DQ-B-0001基因组中有2个次级代谢产物合成基因簇，包括萜烯类、III型聚酮合酶，其中III型聚酮合酶与烷基间苯二酚的相似度为100%，而萜烯类与7-脱氧密旋霉素的相似度仅为5%，极有可能是未知化合物。

目前，白酒中的健康因子是行业的研究重点，主要包括酯类、酸类、酚类、萜烯类、酯肽类、吡嗪类等与人体健康密切相关的活性成分。烷基间苯二酚是一类具有两亲性的特殊酚类酯，具有抗氧化[41]、抗菌[42]、预防癌症[43]、抑制糖脂代谢酶活性[44-45]等多种生理功能，是重要的功能性因子；萜烯类化合物是一类由2个及以上异戊二烯聚合而成的烃类，具有抗氧化[46]、抗菌[47]、抗肿瘤[48]等生理活性，是白酒中最新发现的一类重要健康因子[49]。因此，该菌株可能产生对人体健康有益的物质成分，加强对其代谢产物的研究，挖掘其对白酒的健康价值，有望为中国白酒的健康特性提供数据支撑。

表3　菌株XJ-DQ-B-0001基因组中次级代谢基因簇的预测

Table 3　Prediction of secondary metabolite gene clusters in strain XJ-DQ-B-0001 genome

产物类型	基因组位点		最相似已知基因簇		
	起始位点	结束位点	最相似产物	相似度/%	来源
III型聚酮合酶	1	37 706	烷基间苯二酚	100	*S. griseus* subsp. *griseus* NBRC 13350
萜烯类	247 588	268 502	7-脱氧密旋霉素	5	*S. pactum*

3　结论

从高温大曲中筛选到一株放线菌，经形态、生理生化、分子生物学鉴定后，将菌株XJ-DQ-B-0001确定为芬克纤维微菌。在菌株生理生化特征鉴定过程中发现该菌株能水解淀粉，具备将淀粉质原料降解为可发酵性糖的潜能。为进一步解析其功能特性，采用高效液相色谱仪、气相色谱仪对菌株的代谢产物进行检测，并采用Illumina测序技术对菌株的全基因组进行测序。

在菌株发酵液中共检测到18种代谢产物，其中乳酸、乙酸、β-苯乙醇、乙酸乙酯等14种代谢产物的质量浓度均比对照组高，且部分产物是白酒中的呈香及呈味物质，对白酒的香气、口感、风格均有一定程度的影响。

菌株基因组全长 3 043 158 bp，GC 占比 74.57%，共预测到 2 769 个编码基因。对编码基因进行功能注释，注释结果显示，菌株氨基酸代谢活跃，基因组中注释到缬氨酸、亮氨酸、酪氨酸、苯丙氨酸等 19 种氨基酸的代谢。菌株基因组中含有参与淀粉质原料降解为可发酵性糖的 α-淀粉酶（EC 3.2.1.1）、α-葡萄糖苷酶（EC 3.2.1.20）的基因，以及平衡酒体中酸和酯占比、协调酒体风味的羧酸酯酶（CE 3.1.1.1）基因。此外，菌株基因组中次级代谢基因簇预测结果显示，菌株具有代谢产生白酒中潜在健康因子——烷基间苯二酚、萜烯类化合物的生物合成基因簇。

综上，作者从形态、生理生化特征、代谢产物以及基因组功能等方面对高温大曲中分离获得的芬克纤维微菌进行了特性解析，表明了放线菌能代谢产生对白酒酿造有益的水解酶、风味物质和健康因子，为酿造环境中放线菌资源的开发和利用提供了数据支撑。

参考文献

[1] WANG D Q，CHEN L Q，YANG F，et al. Yeasts and their importance to the flavour of traditional Chinese liquor：a review[J]. Journal of the Institute of Brewing，2019，125（2）：214-221.

[2] 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.

[3] WANG Y R，CAI W C，WANG W P，et al. Analysis of microbial diversity and functional differences in different types of high-temperature Daqu[J]. Food Science & Nutrition，2021，9（2）：1003-1016.

[4] HUANG Y H，YI Z L，JIN Y L，et al. New microbial resource：microbial diversity，function and dynamics in Chinese liquor starter[J]. Scientific Reports，2017，7（1）：14577.

[5] 吴成，程平言，谢丹，等. 酱香型白酒高温大曲发酵过程中真菌多样性研究[J]. 食品与生物技术学报，2023，42（6）：95-103.
WU C，CHENG P Y，XIE D，et al. Investigation on fungal diversity during high-temperature Daqu fermentation of sauce-flavor Baijiu[J]. Journal of Food Science and Biotechnology，2023，42（6）：95-103.（in Chinese）

[6] LI H，LIAN B，DING Y H，et al. Bacterial diversity in the central black component of Maotai Daqu and its flavor analysis[J]. Annals of Microbiology，2014，64（4）：1659-1669.

[7] SELIM M S M，ABDELHAMID S A，MOHAMED S S. Secondary metabolites and biodiversity of *Actinomycetes*[J]. Journal of Genetic Engineering and Biotechnology，2021，19（1）：72.

[8] 周容，张明春，赵永威，等. 中国白酒中放线菌的研究进展[J]. 酿酒，2019，46（2）：18-22.
ZHOU R，ZHANG M C，ZHAO Y W，et al. Research progress on *Actinomycetes* in Chinese liquor[J]. Liquor Making，2019，46（2）：18-22.（in Chinese）

[9] 杜海. 产土味素菌群对白酒酿造的影响机制及监测控制[D]. 无锡：江南大学，2013.

[10] 张溪桐，徐岩，杜海. 低含水量条件下大曲中抑制土味素的功能微生物解析[J]. 食品与发酵工业，2022，48（13）：55-62.
ZHANG X T，XU Y，DU H. Analysis of the geosmin-inhibiting microorganisms in Daqu under low water content[J]. Food and Fermentation Industries，2022，48（13）：55-62.（in Chinese）

[11] 施思，张霞，杨康卓，等. 放线菌对酿酒微生物调控的初步解析[J]. 酿酒科技，2021（2）：17-20，26.
SHI S，ZHANG X，YANG K Z，et al. Preliminary study on the regulation effect of *Actinomycetes* on brewing microorganisms[J]. Liquor-Making Science & Technology，2021（2）：17-20，26.（in Chinese）

[12] 罗碧霞，郑若欣，程铁辕，等. 浓香型白酒窖泥放线菌的原位分离及代谢特性研究[J]. 食品与发酵工业，2021，47（6）：75-83.
LUO B X，ZHENG R X，CHENG T Y，et al. *In situ* isolation and metabolic characteristics of *Actinomycetes* from strong-flavor Baijiu pit mud[J]. Food and Fermentation Industries，2021，47（6）：75-83.（in Chinese）

[13] CHEN C，YANG H Q，LIU J，et al. Systematic review of *Actinomycetes* in the Baijiu fermentation microbiome[J]. Foods，2022，11（22）：3551.

[14] 杨莉. 3 株高盐环境放线菌功能基因挖掘及菌株 YIM 96748 的 7 个基因簇异源表达初步研究[D]. 昆明：云南大学，2021.

[15] KUMAR S，STECHER G，TAMURA K. MEGA7：molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets[J]. Molecular Biology and Evolution，2016，33（7）：1870-1874.

[16] 张宝玉，李良，吴昊，等. 高效液相色谱法测定酒醅中的乳酸含量[J]. 酿酒科技，2019（2）：109-112.
ZHANG B Y，LI L，WU H，et al. Determination of lactic acid content in fermented grains by HPLC[J]. Liquor-Making Science & Technology，2019（2）：109-112.（in Chinese）

[17] 孙优兰，尹延顺，骆红波，等. 不同产区酱香型白酒感官特性及特征风味分析[J]. 酿酒科技，2023(7)：57-64，71.
SUN Y L，YIN Y S，LUO H B，et al. Analysis of sensory characteristics and typical flavor of Jiangxiang Baijiu from different producing areas [J]. Liquor-Making Science & Technology，2023(7)：57-64，71.(in Chinese)

[18] CHEN S F，ZHOU Y Q，CHEN Y R，et al. Fastp：an ultra-fast all-in-one FASTQ preprocessor [J]. Bioinformatics，2018，34(17)：i884-i890.

[19] BANKEVICH A，NURK S，ANTIPOV D，et al. SPAdes：a new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing [J]. Journal of Computational Biology，2012，19(5)：455-477.

[20] WALKER B J，ABEEL T，SHEA T，et al. Pilon：an integrated tool for comprehensive microbial variant detection and genome assembly improvement[J]. PLoS One，2014，9(11)：e112963.

[21] CONESA A，GÖTZ S. Blast2GO：a comprehensive suite for functional analysis in plant genomics[J]. International Journal of Plant Genomics，2008(1)：619832.

[22] POWELL S，FORSLUND K，SZKLARCZYK D，et al. eggNOG v4.0：nested orthology inference across 3686 organisms[J]. Nucleic Acids Research，2014，42：231-239.

[23]KANEHISA M，GOTO S，SATO Y，et al. Data，information，knowledge and principle：back to metabolism in KEGG[J]. Nucleic Acids Research，2014，42：199-205.

[24] LOMBARD V，GOLACONDA RAMULU H，DRULA E，et al. The carbohydrate-active enzymes database (CAZy) in 2013[J]. Nucleic Acids Research，2014，42：D490-D495.

[25] XIAO Z J，WANG X M，HUANG Y L，et al. Thermophilic fermentation of acetoin and 2，3-butanediol by a novel *Geobacillus* strain [J]. Biotechnology for Biofuels，2012，5(1)：88.

[26] HAMILTON J F. Using comprehensive two-dimensional gas chromatography to study the atmosphere[J]. Journal of Chromatographic Science，2010，48(4)：274-282.

[27] 骆茂香，徐兴江，刘磊. 基于UPLC法测定酱香型白酒原辅料中5种非挥发性有机酸[J]. 酿酒科技，2023(9)：137-140.
LUO M X，XU X J，LIU L. Determination of five non-volatile organic acids in raw and auxiliary materials of Jiangxiang Baijiu by UPLC[J]. Liquor-Making Science & Technology，2023(9)：137-140.(in Chinese)

[28] WEI Y，ZOU W，SHEN C H，et al. Basic flavor types and component characteristics of Chinese traditional liquors：a review[J]. Journal of Food Science，2020，85(12)：4096-4107.

[29] 毕荣宇，乔敏莎，卢君，等. 气相色谱-内标法测定白酒中3种高级脂肪酸乙酯含量[J]. 中国酿造，2022，41(12)：240-244.
BI R Y，QIAO M S，LU J，et al. Determination of 3 higher fatty acid ethyl esters content in Baijiu by gas chromatography-internal standard method [J]. China Brewing，2022，41(12)：240-244.(in Chinese)

[30] 郭建华，郭宏文，邹东恢，等. 白酒酒醅发酵过程中酶活与酯类生成的相关性分析与主成分分析[J]. 食品与发酵工业，2013，39(11)：44-49.
GUO J H，GUO H W，ZOU D H，et al. The correlation analysis and principal component analysis between enzyme activties and esters production during fermentation of liquor fermented grains [J]. Food and Fermentation Industries，2013，39(11)：44-49.(in Chinese)

[31] ZHU Q，CHEN L Q，PENG Z，et al. The differences in carbohydrate utilization ability between six rounds of sauce-flavor Daqu [J]. Food Research International，2023，163：112184.

[32] WEI J L，LU J，NIE Y，et al. Amino acids drive the deterministic assembly process of fungal community and affect the flavor metabolites in Baijiu fermentation [J]. Microbiology Spectrum，2023，11(2)：e0264022.

[33] CHOI Y J，LEE J，JANG Y S，et al. Metabolic engineering of microorganisms for the production of higher alcohols[J]. mBio，2014，5(5)：e01524.

[34] MARILLEY L，CASEY M G. Flavours of cheese products：metabolic pathways，analytical tools and identification of producing strains [J]. International Journal of Food Microbiology，2004，90(2)：139-159.

[35] WANG B W，WU Q，XU Y，et al. Synergistic effect of multiple saccharifying enzymes on alcoholic fermentation for Chinese Baijiu production [J]. Applied and Environmental Microbiology，2020，86(8)：e00013.

[36] ZEEMAN S C，KOSSMANN J，SMITH A M. Starch：its metabolism，evolution，and biotechnological modification in plants[J]. Annual Review of Plant Biology，2010，61：209-234.

[37] 岳振峰，陈小霞，彭志英. α-葡萄糖苷酶研究现状及进展[J]. 食品与发酵工业，2000，26(3)：63-67，98.
YUE Z F，CHEN X X，PENG Z Y. Status quo and advance of research on α-glucosidase [J]. Food and Fermentation Industries，2000，26(3)：63-67，98.(in Chinese)

[38] 许滢，王蕾，魏贝贝，等. 高聚合度异麦芽寡糖的制备及体外益生功能评价[J]. 食品与生物技术学报，2023，42(1)：66-74.

XU Y，WANG L，WEI B B，et al. Synthesis of isomaltooligosaccharides with high degree of polymerization and its *in vitro* probiotic function evaluation[J]. Journal of Food Science and Biotechnology，2023，42(1)：66-74.(in Chinese)

[39] CHEN Y F，BLACK D S，REILLY P J. Carboxylic ester hydrolases：classification and database derived from their primary，secondary，and tertiary structures[J]. Protein Science，2016，25(11)：1942-1953.

[40] 张杰，侯珺淇，代振玉，等. 一株产羧酸酯酶菌的鉴定及酯酶特征的研究[J]. 食品工业科技，2021，42(19)：126-134.
ZHANG J，HOU J Q，DAI Z Y，et al. Identification of a strain with carboxylesterase and its enzymatic character[J]. Science and Technology of Food Industry，2021，42(19)：126-134.(in Chinese)

[41] GLIWA J，GUNENC A，AMES N，et al. Antioxidant activity of alkylresorcinols from rye bran and their protective effects on cell viability of PC-12 AC cells[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry，2011，59(21)：11473-11482.

[42] PATZKE H，ZIMDARS S，SCHULZE-KAYSERS N，et al. Growth suppression of *Fusarium culmorum*，*Fusarium poae* and *Fusarium graminearum* by 5-*n*-alk(en)ylresorcinols from wheat and rye bran[J]. Food Research International，2017，99：821-827.

[43] ZHAO Y T，SHI L，HU C L，et al. Wheat bran for colon cancer prevention：the synergy between phytochemical alkylresorcinol C21 and intestinal microbial metabolite butyrate[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry，2019，67(46)：12761-12769.

[44] ANDERSSON U，DEY E S，HOLM C，et al. Rye bran alkylresorcinols suppress adipocyte lipolysis and hormone-sensitive lipase activity[J]. Molecular Nutrition & Food Research，2011，55(Suppl.2)：S290-S293.

[45] REJMAN J，KOZUBEK A. Long-chain orcinol homologs from cereal bran are effective inhibitors of glycerophosphate dehydrogenase [J]. Cellular and Molecular Biology Letters，1997，4(2)：411-419.

[46] BOURGOU S，PICHETTE A，LAVOIE S，et al. Terpenoids isolated from Tunisian *Nigella sativa* L. essential oil with antioxidant activity and the ability to inhibit nitric oxide production[J]. Flavour and Fragrance Journal，2012，27(1)：69-74.

[47] WANG C Y，CHEN Y W，HOU C Y. Antioxidant and antibacterial activity of seven predominant terpenoids[J]. International Journal of Food Properties，2019，22(1)：230-238.

[48] GARG S，KAUL S C，WADHWA R. Cucurbitacin B and cancer intervention：chemistry，biology and mechanisms (review)[J]. International Journal of Oncology，2018，52(1)：19-37.

[49] 徐占成，陈勇，莫凯，等. 剑南春酒中萜烯类生理活性物质的分析研究[J]. 食品与发酵科技，2009，45(5)：1-2.
XU Z C，CHEN Y，MO K，et al. The research of terpenes in Jiannanchun liquor by GC×GC-TOFMS [J]. Food and Fermentation Technology，2009，45(5)：1-2.(in Chinese)

（责任编辑：史润东东）