

汾酒大曲中乳酸菌的调查研究

张秀红^{1,2}, 陈 栋², 孔 健³, 赵景龙¹

(1. 山西杏花村汾酒厂股份有限公司, 山西 汾阳 032052; 2. 山西师范大学生命科学学院, 山西 临汾 041000;
3. 山东大学生命科学学院, 山东 济南 250100)

摘要: 通过选择性培养基对清香型汾酒大曲中的乳酸菌进行计数。结果表明, 将汾酒大曲贮存期从 3 个月增加到 6 个月, 乳酸菌非但没有减少, 反而略有增加。当贮存到 6 个月时, 红心曲中乳酸菌数量最多, 达到 7.10×10^9 cfu/g, 其次是清茬曲 5.33×10^9 cfu/g, 最后是后火曲 2.42×10^9 cfu/g。通过发酵类型实验发现, 仅有菌株 QR6 产气为异型发酵乳酸菌, 进一步通过提取分析 16S rDNA 将其鉴定为融合魏氏菌。

关键词: 汾酒大曲; 乳酸菌; 异型发酵; 融合魏氏菌

中图分类号: TS261.1; TS262.3; TS261.4 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-9286(2012)05-0051-04

Study on Lactic Acid Bacteria in Fenjiu Daqu

ZHANG Xiuhong^{1,2}, CHEN Dong², KONG Jian³ and ZHAO Jinglong¹

(1. Shanxi Xinhua Chun Fenjiu Distillery Co. Ltd., Fenyang, Shanxi 032052; 2. Life Science College of Shanxi Normal University, Linfen, Shanxi 041000; 3. Life Science College of Shandong University, Ji'nan, Shandong 250100, China)

Abstract: The number of lactic acid bacteria in Fenjiu Daqu was counted by use of selective culture mediums. The results showed that, with the storage period increased from three months to six months, lactic acid bacteria number in Daqu did not decrease but increased slightly; the number of lactic acid bacteria reached the highest as 71.0×10^8 cfu / g in Hongxinqu, then as 5.33×10^8 cfu / g in Qingchaqu, and as 2.42×10^9 cfu/g in Houhuoqu. Fermentation type experiments indicated that only strain QR6 was heter-fermentation lactic acid bacteria, and it was further identified by 16S rDNA identification as *Weissella confuse*.

Key words: Fenjiu Daqu; lactic acid bacteria; heterfermentation; *Weissella confuse*

山西汾酒是我国清香型白酒的典型代表, 历史悠久、工艺独特, 具有入口绵、落口甜、饮后余香、回味悠长等特色, 在国内外消费者中享有较高的知名度、美誉度和忠诚度。汾酒的独特工艺体现在其典型的制曲酿酒^[1]。中国白酒生产用的大曲以大麦、小麦和豌豆为原料, 经粉碎、配料、成型、培曲、成熟等过程而制成, 其耗工耗时绝对不比酿酒过程少^[2]。而且, 大曲的特点如天然多菌种接种、生料固体发酵、部分环节纯手工操作等都大大增加了其复杂性。

汾酒酿造的原理主要是利用微生物提供的各种酶, 将原料中的淀粉降解为发酵性糖类, 再利用酵母菌把糖转化为乙醇, 同时产生大量风味物质^[3]。将粮食转化为酒必须有产生糖化酶的霉菌和酿酒的酵母, 因此这些微生物受到了研究工作者的极大关注^[4-5]。中国白酒酿造中还有一类很关键的微生物——乳酸菌, 乳酸菌产生的乳酸与乙醇所形成的乳酸乙酯是中国白酒的特征性物质, 但由于乳酸菌时常会轻度过量生长而导致产酸过多, 影响到白酒的产量和质量, 所以其在白酒酿造中是功过皆

有, 不但没有得到重视反而被一些观点认为是白酒生产的杂菌。

汾酒生产中也有大量乳酸菌, 但对乳酸菌的研究较少。本实验以汾酒大曲为材料, 分析其中乳酸菌的存在数量, 并对主要乳酸菌纯化鉴定, 为正确评价乳酸菌在汾酒酿造中的作用, 以及更好地应用乳酸菌生产高质量的汾酒提供必要的理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料、仪器

1.1.1 材料

红心曲、清茬曲、后火曲, 汾酒厂提供。

MRS 培养基: 牛肉蛋白粉 10 g, 鱼肉汁 10 g, 酵母浸出汁粉 5 g, 葡萄糖 20 g, 醋酸钠 5 g, 柠檬酸二铵 2 g, 吐温-80 0.1 g, 硫酸镁 0.58 g, 硫酸锰 0.28 g, 蒸馏水 1000 mL, pH6.2~6.4, 121 °C 灭菌 15 min 后备用。

1.1.2 实验器具及仪器

锥形瓶、试管、酒精灯、电子分析天平、枪头、摇床、培

收稿日期: 2012-02-10

作者简介: 张秀红(1970-), 女, 山西襄汾人, 副教授, 博士。

养皿、霉菌培养箱、计数器、接种环、载玻片、盖玻片、光学显微镜、高压灭菌锅、量筒、pH试纸、移液管、胶头滴管、滤纸、镊子洗耳球、称量纸、玻璃棒、研钵、研磨棒、烧杯、微量移液器(100~1000 μL)。

1.2 方法

1.2.1 乳酸菌计数^[6-7]

取各种大曲样品 25 g, 研磨碎后在无菌条件下加入装有 225 mL 无菌水的锥形瓶中, 振荡 30 min, 制得 10^{-1} 稀释液。无菌操作继续逐级稀释至 10^{-8} 。选取 3 个连续的梯度, 分别吸取 0.2 mL 上述稀释液注入到灭过菌的培养皿中, 每个梯度 3 个重复。将 MRS 培养基融化, 降温至 45 $^{\circ}\text{C}$ 左右, 倒入上述培养皿中, 注意要与稀释液混匀。待其凝固后, 于 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱中倒置培养。

培养 24~48 h, 取出培养皿, 挑选菌落数在 30~300 个之间的平板, 便于计算每克样品中的菌数。同时注意同一个稀释度的 3 个培养皿菌落数不能相差太大。连续 3 个稀释度计算出的菌落数也不能相差太大, 如相差太大会使试验不准确。计算时先算出同一稀释度的 3 个培养皿中菌落平均数, 然后按公式计算:

每克样品中乳酸菌数

= 同一稀释度 3 个培养皿的菌落平均数 $\times$ 稀释倍数 $\times 5$

1.2.2 乳酸菌的菌落特征观察

在无菌条件下, 挑取菌落特征较典型的菌株, 在无菌平板上作四区划线。将其倒置于 28 $^{\circ}\text{C}$ 温箱中培养 5~7 d, 获得单菌落。将平板上的单菌落接到固体斜面上, 置于 28 $^{\circ}\text{C}$ 温箱中培养 5~7 d; 再放于 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中冷藏保存。

乳酸菌菌落特征从以下几个方面描述: 菌落表面形态是否光滑、皱褶、放射状、根状等; 菌落边缘形态是否整齐, 所呈有无波状、丝状、锯齿状、裂叶状等; 菌落隆起形态分扁平、隆起、草帽状、胶状等; 透明度可分为透明、半透明、不透明等。

1.2.3 乳酸菌显形态观察

用细菌一般的制片方法及简单染色法处理各纯化菌株, 在光学显微镜下观察。

1.2.4 发酵类型分析

将 MRS 液体培养基分装于试管中, 分别放入杜氏小管, 并使杜氏小中充满液体, 121 $^{\circ}\text{C}$ 灭菌后备用; 将分离纯化的乳酸菌菌株接种在上述试管中, 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养观察是否有气体出现。

1.2.5 乳酸菌的分子生物学鉴定

1.2.5.1 乳酸菌基因组 DNA 的提取^[8]

收集过夜培养的乳酸菌菌液 1000 μL 于灭过菌的 EP 离心管内, 8000 r/min 离心 10 min, 弃上清液; 再加入

1000 μL 菌液, 离心, 循环 3 次收集菌体; 然后取 600 μL TE 将沉淀洗涤 1 次, 5000 r/min 离心 10 min, 弃上清液, 经沉淀重悬于 TE 中; 加入 90 μL 溶菌酶使终浓度为 6 mg/mL, 37 $^{\circ}\text{C}$ 温浴 2 h; 再补加 210 μL TE, 加 10 % SDS 40 μL 至终浓度为 1 %, 缓慢混匀至澄清; 加蛋白酶 K 2 μL , 37 $^{\circ}\text{C}$ 温浴 3 h; 用等体积 Tris 酚 / 氯仿 / 异戊醇 (25:24:1) 抽提, 10000 r/min 离心 10 min, 取上层清液, 再用等体积氯仿 / 异戊醇抽提 1 次, 混匀后以 10000 r/min 离心 10 min, 每次用宽口吸管移取上清液。向上清液中加入 2 倍体积的预冷无水乙醇, 用 1/10 体积的 3 mol/L NaCl 沉淀 DNA, 缓慢颠倒至出现絮状沉淀; 于 -20 $^{\circ}\text{C}$ 保存 1 h, 离心收集 DNA, 10000 r/min 离心 10 min, 弃上清液, 再用 100 μL 70 % 乙醇浸润 DNA, 缓慢颠倒, 保持沉淀在底部, 8000 r/min 离心 7 min, 弃上清液, 晾至无味; 用 20 μL TE 溶解 DNA。用 0.8 % 的琼脂糖凝胶电泳对所提基因组 DNA 进行检验。

1.2.5.2 16S rDNA PCR 扩增

乳酸菌基因组 DNA 经 10 倍稀释后作为 16S rDNA PCR 扩增的模板; 使用的引物序列为 27F: 5'-AGAG TTTGAT CMTGGCT CAG -3' 和 1492R: 5' -TACGG HTACC TTACG ACTT -3'; 按产品推荐 PCR 反应条件为 94 $^{\circ}\text{C}$ 、5 min 预变性, 然后循环 30 次 (94 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 58 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 2 min), 最后 72 $^{\circ}\text{C}$ 保温 7 min。PCR 产物于 -20 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

1.2.5.3 测序及序列分析

乳酸菌菌株的 16S rDNA 片段委托北京三博远志生物技术有限公司进行测序, 所得序列用 NCBI 的 Blast 软件 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 进行序列同源性分析。

2 结果与分析

2.1 汾酒大曲中乳酸菌数量分析

汾酒生产用的清茬曲、红心曲和后火曲样品逐级稀释后, 利用 MRS 培养后计数, 结果见图 1。

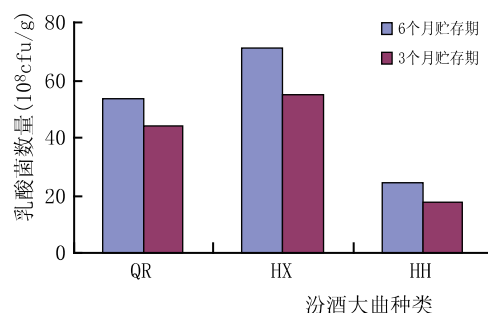


图1 汾酒大曲中乳酸菌数量

从图 1 中可以看出, 3 种大曲中的乳酸菌都非常丰富, 达到 10^9 cfu/g 以上, 而且在贮存过程中乳酸菌都有略

为增加的趋势。贮存 6 个月时的 3 种曲的乳酸菌数量略有不同,其中红心曲中乳酸菌数量最多,达到 5.33×10^9 cfu/g, 其次是清茬曲 7.10×10^9 cfu/g, 最后是后火曲 2.42×10^9 cfu/g。

2.2 乳酸菌菌落形态及显微形态分析

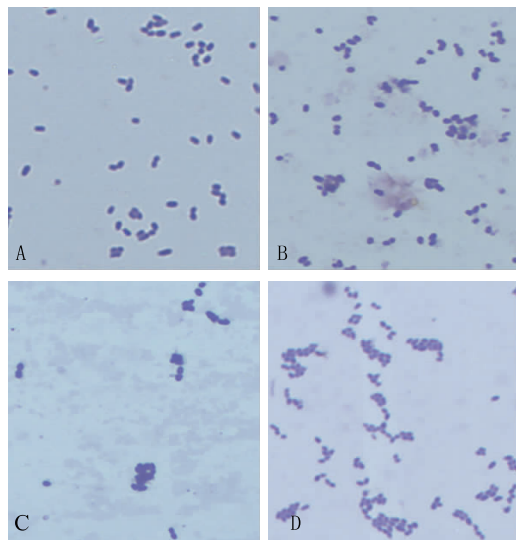
对汾酒大曲中分离到的乳酸菌为进一步分类研究,先观察其菌落特征,结果见表 1。

表 1 汾酒大曲乳酸菌菌株的菌落特征

菌株	干湿	形状	大小 (mm)	透明	边缘	颜色	表层
QR1	湿润	规圆	2.2	不透明	整齐	白色	下层
QR2	湿润	规圆	2.0	不透明	整齐	中白边浅白	下层
QR5	湿润	侧视 圆形					中层 斜插
QR6	湿亮	规圆	1.5	透明	整齐	浅黄	下层
HXR3	湿润	规圆	1.5	不透明	整齐	中白边浅白	上层
HXR7	湿润	不规圆	5	不透明	整齐	中浅白边白色	下层
HHR3	湿润	规圆	1.0	不透明	整齐	浅白	下层
HHR6	湿润	规圆	1.5	不透明	整齐	中白边无色	下层

从表 1 中可以看出,乳酸菌具有典型的菌落特征,表面湿润,绝大多数呈规则的圆形,边缘整齐;绝大多数是透明、白色,由于各菌的好氧性不同,故其在 MRS 固体培养基上分布不均一,有的在表层,有的在下层,还有的在中层。

将从不同类型大曲中分离的乳酸菌按常规制片后,观察其显微形态,结果见图 2。



A: QR1 菌株; B: QR6 菌株; C: HXR2 菌株; D: HHR1 菌株

图 2 乳酸菌的显微形态图

从图 2 中可以看出, 汾酒大曲经过 3~6 个月贮存后, 乳酸菌数量仍然很多, 而且多为短杆状, 说明乳酸菌是汾酒酿造中重要的微生物菌种。在干燥贮存及陈化过程中并没有被完全淘汰掉。

2.3 代表菌株的分子生物学鉴定

对汾酒大曲中分离纯化的菌株经发酵类型分析发现, 只有菌株 QR6 为异型发酵乳酸菌。进一步对 QR6 进行分子生物学鉴定。利用蛋白酶/SDS 法提取菌株 QR6 的基因组 DNA, 结果见图 3; 利用细菌通用引物 PCR 扩增其 16S rDNA 基因片段, 结果见图 4。

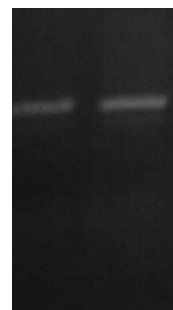


图 3 乳酸菌 QR6 基因组 DNA 电泳图

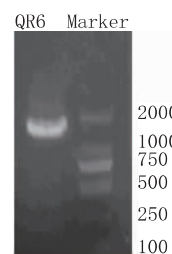


图 4 乳酸菌 QR6 16S rDNA PCR 电泳图

由图 3 可知, 基因组 DNA 条带清晰, 无拖尾, 无弥散, 可用于后续分子生物学操作。从图 4 中可以看出, PCR 扩增产物浓度较大, 条带整齐, 约 1.5 kb, 符合正常的 16S rDNA 基因大小。PCR 产物送北京三博远志生物技术有限公司进行测序, 结果得到了 1148 个核苷酸序列, 经 NCBI 网站上 Blast 软件同源性分析, 结果与融合魏氏菌 AB682449.1 同源度为 99%, 因而可鉴定乳酸菌菌株 QR6 为融合魏氏菌 (*Weissella confusa*)。

3 讨论

我国著名白酒专家沈怡方先生早在 1982 年就曾指出: “我国传统发酵产品白酒风味所具有的独特风格, 是霉菌、酵母和细菌三者协同作用的产物”、“乳酸菌是酿造所有类型白酒的重要菌种, 倘若缺少它参与发酵, 将失去白酒的典型性”。可见乳酸菌是固态白酒生产的重要微生物^[9]。乳酸乙酯是中国白酒的特征物质, 乳酸菌的主要代谢产物是乳酸, 为乳酸乙酯的形成提供了前体物质。乳酸菌可促进美拉德反应、促进酿酒发酵、维护与保持酿酒微生态环境^[10]; 乳酸能降低白酒的刺激感, 增加酒体的醇厚感; 是白酒中最重要的呈味剂及味道改良剂^[11]。当然, 发酵过程中乳酸菌也不能过多, 否则容易导致酒醅发酸, 影

响正常发酵过程^[12]。

本实验发现,汾酒大曲在贮存3~6个月后,乳酸菌仍达到 10^9 cfu/g的数量级,从分离纯化的乳酸菌菌株中发现其中乳杆菌仍占相当大的比例,说明汾酒大曲在贮存陈化过程中对其影响不是很大。不能简单地认为大曲贮存能淘汰无芽孢的生酸细菌,大曲中乳酸菌的组成也需要重新认识^[13]。本实验鉴定的乳酸菌QR6为融合魏氏菌^[14],融合魏氏菌是食品中广泛分布的一种魏氏菌,很多菌株已经证明有益生和保健作用^[15]。陈浩发现,发酵豆制品的优势菌中就有融合魏氏菌^[16]。融合魏氏菌还是工业葡聚糖的生产菌株^[17]。融合魏氏菌属异型发酵乳杆菌,异型发酵乳杆菌代谢时除了乳酸外,还可生成乙醇、乙酸和 CO_2 ,这样既能起到产乳酸改善酒质维持环境等作用,也可以降低乳酸含量,减缓夏季乳酸过多的问题^[12]。而且异型发酵乳酸菌能利用的碳源谱较广,可提高原料利用率,提高产量;很多菌株还具益生功能,因而汾酒发酵中乳酸菌的作用还需进一步研究。

参考文献:

- [1] 沈正祥.清香型白酒(原酒)的工艺的经典理念与创新[J].食品工程,2011(2):3-5.
- [2] 熊子书.中国三大香型白酒的研究(三)清香型·汾酒篇[J].酿酒科技,2005(7):17-21.
- [3] 范文来,徐岩.大曲酶系研究的回顾与展望[J].酿酒,2000(3):35-40.
- [4] 雷振河.汾酒大曲发酵过程中微生物变化的初步分析[J].酿酒科技,2011(6):65-68.
- [5] 李超,穆琳,王建耀,等.汾型大曲的理化指标和微生物指标分析[J].中国酿造,2009(1):140-142.
- [6] GB4789.15—1994,食品卫生微生物学检验霉菌和酵母计数[S].
- [7] 沈萍,范秀荣,李广武.微生物学实验[M].3版.北京:高等教育出版社,1999.
- [8] 宋琳玲,曾光明,陈耀宁,等.固态发酵过程中微生物总DNA提取方法比较[J].环境科学学报,2008(11):102-106.
- [9] 周恒刚.关于乳酸与乳酸菌(上)[J].酿酒科技,1995(5):11-14.
- [10] 谢玉球,钟雨,谢旭,等.乳酸菌在固态法白酒生产中的地位和作用[J].酿酒科技,2008(11):83-86.
- [11] 沈怡方.试论乳酸菌与白酒酿造的关系[J].黑龙江发酵,1981(6):27-31.
- [12] 赵佳,雷振河,吕利华,等.汾酒产酸细菌的分离鉴定及其产酸条件研究[J].食品与发酵工业,2009(12):43-46.
- [13] 敖宗华,陕小虎,沈才洪,等.国内主要大曲相关标准及研究进展[J].酿酒科技,2010(2):104-108.
- [14] 李中华,段雄波.魏斯菌属细菌的分类与鉴定新进展[J].国际检验医学杂志,2006(8):721-723.
- [15] Fusco V., Quero G. M., Stea G., et al. Novel PCR-based identification of *Weissella confusa* using an AFLP-derived marker[J]. International Journal of Food Microbiology, 2011, (145): 437-443.
- [16] 陈浩,樊游,陈源源,等.传统发酵豆制品中原核微生物多样性的研究[J].食品工业科技,2011(9):230-232.
- [17] Shukla S., Goval A. 16S rRNA-Based Identification of a Glucan-Hyperproducing *Weissella confusa* [J]. Enzyme Research, 2011: 1-10.

中国酿酒工业协会白酒分会第四届理事会第三次(扩大)会议在京举行

本刊讯 中国酿酒工业协会白酒分会第四届理事会第三次(扩大)会议于2012年4月26日在北京举行,会议由中国酿酒工业协会白酒分会秘书长赵建华主持。中国酿酒工业协会白酒分会理事长王延才出席会议并做工作报告,报告回顾了2011年白酒行业的发展情况,规模以上白酒企业1233家,产量达到1025.55万千升,工业销售产值3618.4亿元,产品销售收入3746.67亿元,利润总额571.59亿元,上缴税金445.10亿元。产酒大省四川实现销售收入1478.6亿元,占全行业的40%;山东、湖北、贵州、江苏、湖南5省销售收入1261.55亿元,占全行业的33.67%。

白酒行业当前存在的主要问题是:白酒产业集中度不够,生产、流通许可监管困难;白酒行业社会美誉度亟待提升;税收政策对产品结构的影响;产能扩大加剧产业风险;白酒文化影响力薄弱等。

王延才理事长还在报告中介绍了前不久召开的白酒领袖峰会达成的共识。明确了中国白酒的社会属性:“白酒是同时满足精神、文化和物质需求的嗜好性产品,是经济活动、传统交际、礼仪消费中最具典型特征的民族文化产品”。总结了2011年分会所做的工作,提出了2012年分会的工作计划。

大会讨论了王延才理事长的工作报告,认为报告数据详实,有高度、有广度。通过热烈的讨论,代表们对协会的工作提出了一些建设性的意见和建议。会议期间,与会代表参观了京西宾馆设立的名优白酒展示厅,并向参展企业颁发了名优白酒展示证书。会议完成各项议程,圆满结束。(小雨)



理事会会场