

凤兼复合型太白酒微生物区系研究(I): 大曲微生物区系

胡建祥¹ 杨 涛² 蔡官林¹ 吴林蔚² 庄名扬² 徐 炜¹

(1. 陕西省太白酒业有限责任公司, 陕西 眉县 722300; 2. 中国科学院成都生物研究所, 四川 成都 610041)

摘 要: 以凤兼复合型太白酒生产用凤型曲和中高温曲为试验曲, 研究大曲微生物的数量、构成及优势菌的分布, 并通过形态、生理学特性的分析及 16S rRNA 基因序列分析等, 对大曲中主要微生物类群进行了分类鉴定。

关键词: 凤兼复合型太白酒; 凤型曲; 中高温曲

中图分类号: TS262.3; TS261.4; TS261.1; Q93-3 文献标识码: A 文章编号: 1001-9286(2012)05-0055-03

Study on Microbial Communities in Feng & Composite-flavor Taibai Liquor (I): Microflora in Daqu

HU Jianxiang¹, YANG Tao², CAI Guanlin¹, WU Linwei², ZHUANG Mingyang² and XU Wei¹

(1. Taibai Liquor Co.Ltd, Meixian, Shanxi 722300; 2. Chengdu Institute of Biology, Chinese Academy of Sciences, Chengdu, Sichuan 610041, China)

Abstract: Feng-type Daqu and medium-temperature Daqu for the production of Feng & composite-flavor Taibai liquor were used in the experiments to investigate their microbial quantity and the constitution and the distribution of their dominant bacteria. Besides, the main microflora in them were classified and identified through morphological and biochemical physiological identification and 16SrRNA clone analysis.

Key words: Feng & composite-flavor Taibai liquor; Feng-type Daqu; medium-temperature Daqu

中国白酒的发酵过程实际上是各类微生物的生长代谢过程, 不同地域、气候、环境条件及生产工艺, 形成了不同的微生物群系及不同的微生物代谢变化规律, 从而造就不同的白酒风格。

凤兼复合型太白酒是在凤香型太白酒生产工艺基础上, 采用秦岭主峰太白山的雪融之水作酿浆, 选用优质高粱、大米、糯米、小麦为原料, 大麦、豌豆、小麦进行中高温制曲, 采用泥窖固态续糟发酵、老六甑混蒸混烧工艺, 不同于传统凤型白酒和浓香型白酒的工艺和质量特征, 口味特别而自成一格。

为进一步了解和掌握太白酒酿造过程中各类微生物的演变规律, 深入探讨微生物代谢机理与产品质量和风格之间的关系, 以更好地指导生产。本实验采用微生物传统分离鉴定和现代分子生物学方法, 对凤兼复合型太白酒的大曲微生物区系进行了详尽剖析。

1 材料与方法

1.1 材料

收稿日期: 2012-03-21

作者简介: 胡建祥(1962-), 男, 陕西人, 大学本科, 酿造工程师, 国家高级白酒评酒师, 副总经理, 国家白酒评委, 先后主持科研攻关 20 多项, 发表论文 10 余篇。

优先数字出版时间 2012-04-24; 地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/52.1051.TS.20120424.1455.002.html>。

凤型曲、中高温曲(生产中 2 种曲混合使用), 陕西省太白酒业有限责任公司生产。

1.2 培养基

分离、计数培养基: 营养肉汁琼脂(细菌); PYG 培养基、酸性麦芽汁琼脂(酵母菌); 马丁-孟加拉红培养基(霉菌)。

斜面培养基: 营养肉汁琼脂(细菌); 高氏合成一号琼脂(放线菌); 麦芽汁琼脂(酵母菌); PDA 培养基(霉菌)。

1.3 试验方法

1.3.1 微生物分离培养及计数

平皿稀释法^[1]。细菌分别以 37℃ 和 45℃ 培养 48 h; 酵母菌 28℃ 培养 72 h; 霉菌 30℃ 培养 168 h。培养后计数并挑取单菌落, 反复划线, 纯化后挑于斜面培养基保藏备用。

1.3.2 菌种鉴定

1.3.2.1 细菌

用 16S rRNA 基因序列分析方法^[2]。

细菌基因组总 DNA 的提取:接种供试菌于 LB 液体培养基,于 37℃ 振荡培养 16~18 h,12000 r/min 离心收集菌体。若是革兰氏阳性菌,加 50 μL 溶菌酶(浓度为 100 μg/L)于 37℃ 水浴处理 1 h,加入 200 μL 裂解缓冲液(缓冲液含 40 mmol/L Tris-HCl, pH8.0、20 mmol/L 乙酸钠,1 mmol/L EDTA,1 % SDS) 悬浮和裂解细菌细胞,然后加入 66 μL 5 mol/L NaCl 混匀后 65℃ 水浴 10 min,12000 r/min 离心 10 min,取上清液;加入等体积的用 Tris 饱和的苯酚,充分混匀后 12000 r/min 离心 3 min,取水层;加等体积的氯仿充分混匀后 12000 r/min 离心 3 min,小心取出上清液,用预冷的两倍体积的无水乙醇沉淀,15000 r/min 离心 15 min,弃去上清液;用 400 μL 70 % vol 的乙醇洗涤 2 次,真空干燥后,用 50 μL TE 或超纯水溶解 DNA,于-20℃ 保存备用。

PCR 扩增:以总 DNA 为模板,细菌通用引物 EU27F 和 1490R 分别为正向引物和反向引物。PCR 反应体系为(25 μL):10×PCR 缓冲液 2.5 μL, TaqDNA 聚合酶 0.5 μL,正向引物 1 μL,反向引物 1 μL,模板 2 μL,1d NTP2 μL, 无菌超纯水 16 μL;PCR 反应条件:94 预变性 1 min,94℃ 变性 1 min,55℃ 退火 1 min,72℃ 延伸 2 min,共 30 次循环,之后 72℃ 延伸 10 min。

16S rRNA 基因的序列分析:扩增后的片段送上海生物工程技术服务有限公司测序,通过采用美国国家生物技术信息中心的 BLAST 搜索程序,把实验中得到的序列信息与基因库中的基因序列进行比较而获得同源性分析结果。

1.3.2.2 酵母菌

形态和生理特性相结合^[3-4]。形态特性主要包括有无孢子、掷孢子、冬孢子等及其形状、特点和数目,无性繁殖方式是否为裂殖或芽殖及出芽方式以及是否有真菌丝或假菌丝。生理特性主要包括糖的发酵和同化,硝酸盐的利用,产酸、产酯等。

1.3.2.3 霉菌

群体形态和个体特征结合^[3-5]。

2 结果与分析

2.1 大曲中微生物数量

中高温曲的制曲温度高于凤型曲,反映在微生物数量上,无论细菌、酵母菌还是霉菌,中高温曲均少于凤型曲。在细菌数量上,虽然在 37℃ 培养和 45℃ 培养时,中高温曲的数量均低于凤型曲,但从 45℃ 培养与 37℃ 培养的细菌数量之比上看,中高温曲要高于凤型曲(表 1)。

2.2 大曲中微生物种类及分布

2.2.1 细菌

表 1 2 种大曲微生物数量 (个/g 干曲)

样品	细菌 (37℃ 培养)	细菌 (45℃ 培养)	酵母菌	霉菌
中高温曲	5.1×10^5	3.6×10^5	3.2×10^3	4.1×10^4
凤型曲	7.5×10^5	4.3×10^5	4.9×10^3	8.4×10^5

在 2 种大曲中共分离纯化到 17 株菌,比较了菌落形态、斜面培养特征及显微形态,将这些菌株合并为 13 株(另 3 株正鉴定中)。经 16S rRNA 基因序列分析,分属于芽孢杆菌属、假单孢菌属、节杆菌属等,以芽孢杆菌属尤其是地衣芽孢杆菌、解淀粉芽孢杆菌和枯草芽孢杆菌为主要微生物类群。中高温曲中芽孢杆菌占的比例高于凤型曲,这些芽孢杆菌均能产生淀粉酶或蛋白酶。具体鉴定结果及在曲中数量见表 2 和表 3。

表 2 2 种大曲细菌种类

菌株	相近菌株	同源性 (%)
QTBB-1	<i>Bacillus licheniformis</i> (地衣芽孢杆菌)	100
QTBB-2	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> (解淀粉芽孢杆菌)	100
QTBB-3	<i>Bacillus subtilis</i> (枯草芽孢杆菌)	99
QTBB-4	<i>Bacillus pumilus</i> (短小芽孢杆菌)	99
QTBB-5	<i>Bacillus cereus</i> (蜡状芽孢杆菌)	99
QTBB-6	<i>Bacillus megaterium</i> (巨大芽孢杆菌)	100
QTBB-7	<i>Bacillus firmus</i> (坚强芽孢杆菌)	99
QTBB-8	<i>Bacillus coahuilensis</i>	99
QTBB-9	<i>Arthrobacter aresens</i> (金黄节杆菌)	99
QTBB-10	<i>Pseudomonas stutzeri</i> (施氏假单孢菌)	100

表 3 细菌在 2 种大曲中的数量 (个/g 干曲)

菌名	凤型曲	中高温曲
地衣芽孢杆菌	1.8×10^5	2.6×10^5
解淀粉芽孢杆菌	7.8×10^4	4.3×10^4
枯草芽孢杆菌	9.9×10^4	1.3×10^5
短小芽孢杆菌	未分离到	5.8×10^3
蜡状芽孢杆菌	7.0×10^3	4.2×10^3
巨大芽孢杆菌	6.8×10^4	4.7×10^4
坚强芽孢杆菌	5.1×10^3	未分离到
<i>Bacillus coahuilensis</i>	9.3×10^3	未分离到
其 金黄节杆菌	4.2×10^4	6.0×10^3
他 施氏假单孢菌	6.5×10^4	8.7×10^3
未鉴定菌株	1.9×10^5	5.3×10^3

2.2.2 酵母菌

从 2 种大曲中共分离纯化到 5 株形态和培养特征不同的酵母菌株。通过形态特性和生理特性,参照《常见与常用真菌》、《酵母菌的特征与鉴定手册》,分别将其归属于酿酒酵母、热带假丝酵母、产朊假丝酵母、异常汉逊酵母、扣囊内孢霉。这些酵母菌在 2 种大曲中均有分布,但热带假丝酵母、产朊假丝酵母和异常汉逊酵母等 3 种产酯和芳香物质的菌株在中高温曲中占酵母总数的 66%,而凤型曲中这 3 种菌只占酵母总数的 39%,结果见表 4。

表4 酵母菌在2种大曲中的数量 (个/g干曲)

菌名	凤型曲	中高温曲
酿酒酵母	1.6×10^3	1.1×10^3
产朊假丝酵母	7.8×10^2	5.5×10^2
热带假丝酵母	8.3×10^2	5.0×10^2
异常汉逊酵母	3.0×10^2	3.7×10^2
扣囊内孢霉	1.4×10^3	7.0×10^2

2.2.3 霉菌

霉菌的主要功能是产生各种生物酶,2种大曲的霉菌种类相似,均分离纯化到12株菌,分属于曲霉属中的米曲霉、阿姆斯特丹曲霉、黑曲霉、杂色曲霉、文氏曲霉、红曲霉属、根霉属、毛霉属、青霉属、犁头霉属和镰刀菌属等。凤型曲中以阿姆斯特丹曲霉和根霉为主;中高温曲中以米曲霉为主;中高温曲的红曲霉数量多于凤型曲。其中阿姆斯特丹曲霉在其他大曲微生物区系中未分离到,具体结果见表5。

表5 霉菌在2种大曲中的数量 (个/g干曲)

菌种	凤型曲	中高温曲
米曲霉	3.7×10^3	3.1×10^4
阿姆斯特丹曲霉	8.2×10^5	1.9×10^3
黑曲霉	2.4×10^3	2.8×10^3
烟曲霉	1.3×10^3	7.1×10^2
杂色曲霉	6.0×10^2	8.4×10^2
文氏曲霉	1.7×10^3	1.0×10^3
红曲霉	4.4×10^2	5.3×10^2
根霉	1.0×10^4	1.4×10^3
毛霉	2.5×10^2	1.9×10^2
青霉	3.1×10^2	1.1×10^2
镰刀菌属	1.1×10^2	1.3×10^2
蓝色犁头霉	1.9×10^2	3.4×10^2

3 结论

特殊的地理环境和独特的生产工艺形成了太白酒大

曲特殊的微生物区系。其中,细菌以地衣芽孢杆菌、枯草芽孢杆菌、解淀粉芽孢杆菌和巨大芽孢杆菌为主,这些菌株能产生淀粉水解酶和蛋白水解酶,将大分子物质淀粉和蛋白质水解为葡萄糖和氨基酸。酵母菌中产酯酵母不仅量大,而且种类多。霉菌种类较多,有米曲霉、黑曲霉、烟曲霉、文氏曲霉、根霉、毛霉、红曲霉、青霉、镰刀菌属菌株等。阿姆斯特丹曲霉数量较多。该菌株具有嗜干性的特点,能在高渗透压的基质上旺盛发育,在发酵前期糟醅中数量也较多(另文有报道),但在其他相关文献中均未见报道。关于该菌株在太白酒酿造过程中的作用,需要进一步研究。

太白酒大曲中特殊的微生物区系,赋予曲药种类繁多的生物酶,为发酵、产酒、生香提供了良好的微生物基础。

综上所述,太白酒厂特殊的地理环境和独特的生产工艺,形成了与之相适应的特殊微生物区系,从而造就了凤兼复合型太白酒“醇香馥郁,醇厚丰满,绵柔甜爽,诸味谐调,余味舒畅”的独特风格。

参考文献:

- [1] 陈声明,张立钦.微生物学研究技术[M].北京:科学出版社,2006.
- [2] Lane DJ, Pace B, Olsen GJ, et al. Rapid determination of 16S ribosomal RNA Sequences for phylogenetic analyses[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1985,82:6955-6959.
- [3] 中国科学院微生物研究所.常见与常用真菌[M].北京:科学出版社,1978.
- [4] 巴尼特,培恩,亚龙.酵母菌的特征与鉴定手册[M].青岛:青岛海洋大学出版社,1991.
- [5] 魏景超.真菌鉴定手册[M].上海:上海科学技术出版社,1979.

“濮佬酒感官质量专家鉴评会”在筑举行

本刊讯:“濮佬酒感官质量专家鉴评会”于2012年3月28日在贵阳召开。会议由贵州省轻工业科学研究所主办,全国著名白酒专家沈怡方、黄平、吴天祥、方长仲、贾翹彦、李其书、黄永光等和贵州雄正酒业的领导参加了会议。

会议由贵州省轻工业科学研究所所长、贵州省白酒专家、《酿酒科技》主编黄平主持。会上,贵州雄正酒业的董事长李再彬向与会专家及来宾介绍了“佬土世家酒和濮佬酒”的酒体设计及研发过程。专家组对佬土世家酒和濮佬酒进行了认真的感官鉴评,形成一致的鉴评意见为:

一、佬土世家酒

微黄、清澈透明,酱香突出,酒体醇厚、丰满,回味长,空杯留香久。酱香风格典型。

二、濮佬酒

微黄、透明,酱香突出,味醇厚丰满、幽雅、细腻,回味悠长,空杯留香悠久。酱香风格典型。(莹子)



专家鉴评会



著名白酒专家沈怡方