

大曲中微生物研究和检测进展

邢 钢¹ 敖宗华² 邓 波²

(1.四川理工学院生物工程学院,四川 自贡 643000;2.泸州老窖股份有限公司,四川 泸州 646000)

摘 要: 从传统生物学和现代生物学两方面对大曲微生物的研究和检测进行阐述,以期为大曲微生物的研究提供思路,并进一步从微生物的角度指导大曲生产。

关键词: 大曲; 微生物; 研究和检测

中图分类号:Q93-3;TQ925.7;TQ920;TS261.1 文献标识码:B 文章编号:1001-9286(2012)12-0086-04

Research & Detection Progress of Microbes in Daqu

XING Gang¹, AO Zonghua² and DENG Bo²

(1.College of Bioengineering, Sichuan University of Science and Engineering, Zigong, Sichuan 643000;

2.Luzhou Laojiao Co.Ltd.,Luzhou,Sichuan 646000,China)

Abstract: The research and detection progress of microbes in Daqu was elaborated from two aspects including traditional biology and modern biology, which might provide new approaches to Daqu microbes research and further provide scientific guidance for Daqu production from the angle of microbiology.

Key words: Daqu; microbes; research and detection

大曲的生产是靠传统工艺自然接种,它是富集、培养有益微生物和其代谢产物的载体。大曲是通过网罗自然界中的各种微生物在其自身生长而制成的,是大曲酒生产中的糖化发酵剂,因此大曲中的微生物类群极为丰富,是多种微生物的混合体系,主要包括霉菌、细菌和酵母菌^[1]。多年来,对大曲中微生物的研究与检测的报道不少,也取得了一些进展。笔者现就相关的研究成果进行总结,阐述参与酒酿发酵的大曲微生物研究和检测进展。

1 大曲微生物

大曲微生物主要有4类:霉菌、细菌、酵母菌、放线菌。其中放线菌为数不多,而且在大曲中的作用尚不十分明显。

1.1 细菌

大曲中的细菌主要有醋酸菌、乳酸菌、芽孢杆菌等。无论是大曲培制和酿酒都离不开细菌。细菌为发酵产香的主要动力。茅台成品大曲中90%以上微生物为细菌,被定义为细菌曲,且茅台大曲中细菌绝大多数为嗜热芽孢杆菌^[2]。梭状芽孢杆菌为浓香型白酒发酵过程中主体香己酸乙酯的前体物质己酸的产生菌。乳酸菌等细菌则发酵产生乳酸及各种氨基酸,为酯化提供前体,与酵母产生的酒精合成乳酸乙酯。同时,在酿造过程中乳酸菌具有

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等作用。

1.2 霉菌

大曲中的霉菌分为曲霉(黑曲霉、红曲霉、黄曲霉、米曲霉)、根霉、毛霉、头霉、青霉等。大曲的制作原理就是最大限度地让适合于发酵或对酿造有益的霉菌生长繁殖。由于霉菌的结构和形态独特,可以使大曲在培制过程中形成五颜六色的曲块,在很大程度上,大曲的质量是由其颜色来判定的。由此可见霉菌对于大曲的重要性。

曲霉和根霉是主要糖化菌,其中,黑曲霉的糖化力较高,根霉也具有较高的糖化力,米曲霉及黄曲霉的糖化力较低,而且不耐酸,但液化力及蛋白质分解力较强,一般用于制米曲汁的米曲培养。在许多名优酒大曲中,能分离出红曲霉和拟内孢霉,其均具产糖化酶的能力^[3]。

1.3 酵母菌

酵母菌在发酵酿酒过程中,具有两个十分突出的作用,即酒化和酯化作用。大曲中的酵母属酵母、汉逊酵母能产生活力较强的酒化酶,能将葡萄糖通过EMP途径代谢转化成酒的主成分——乙醇,这是白酒最重要也是最基础的物质。产酯酵母代谢产生大量的酯类物质,如己酸乙酯等,可赋予大曲酒浓郁的芬芳。酵母菌代谢还能产生

收稿日期:2012-08-31

优先数字出版时间 2012-11-19 地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/52.1051.TS.20121119.0916.001.html>。

许多物质,如甘油和其他多元醇等,对酒体的完善与丰满有着重要的作用。

应用传统培养方法检测到大曲中的酵母主要有酿酒酵母、汉逊酵母、毕氏酵母、拟内孢霉等,其中拟内孢霉是大曲上霉的主要微生物^[4]。

1.4 放线菌

刘鸿^[5]等从白酒大曲中分离出的放线菌,分别用淀粉培养基和纤维素刚果红培养基对2种菌作初筛,并进一步通过固体发酵酶活测定的复筛,得到可高产淀粉酶和纤维素酶的菌株。

2 大曲微生物研究与检测

2.1 传统生物学方法

传统的微生物鉴定方法,主要指利用传统方法对微生物进行分离、培养,显微镜下观察微生物细胞形态及培养基上的菌落形态,微生物利用碳源、N源、无机盐等物质的能力,微生物对氧的需求,以及微生物重要的生理生化指标特征等,对微生物进行分析和鉴定^[6]。直接镜检计数和平板菌落计数是常用的统计方法。

建国以来,我国科研工作者一直进行着对大曲微生物区系的研究,特别是20世纪80年代后期以来,随着对传统固态发酵白酒的再认识,大曲微生物的研究逐渐进入高潮。酿酒科技工作者通过对大曲微生物群落的不断探索,先后分离出多种酿酒功能微生物。

王忠彦^[7]等对郎酒高温大曲中的微生物进行培养计数,发现细菌最多,霉菌次之,酵母很少。霉菌曲皮与曲心差异不大,曲皮比曲心略多,这是由于在制曲的高温期,部分霉菌被淘汰。

施安辉^[8]等采用稀释平板计数法对雁宾大曲中的细菌类群进行了剖析,并对芽孢杆菌和非芽孢杆菌在大曲中的量比关系进行了探讨。同时,也对主要产酸菌进行了分类。研究表明,芽孢杆菌在细菌总数中只占很小部分,非芽孢杆菌占细菌总数的绝大部分。大曲中细菌主要类群是乳酸菌和醋酸菌;在产酸细菌中乳酸菌最多。细菌优势菌种为乳酸杆菌属,醋杆菌属,芽孢杆菌属,微球菌属。

施安辉^[9]等通过对徐坊大曲的微生物区系及其优势菌的鉴定,结果显示,中高温大曲中芽孢杆菌的数量和种类都较中温大曲多,中温大曲中的酵母主要是酵母属和汉逊氏酵母属,而中高温大曲主要是耐高温的假丝酵母和白地霉占优势;中温大曲的霉菌主要是黑曲霉、毛霉、根霉和青霉,而中高温大曲则主要是米曲霉、红曲霉和土曲霉等。

廖建民^[10]等从四川泸州几个名优酒厂曲药分离到

125株细菌,并按照常规生理生化手段进行了分类。从初步鉴定结果看,芽孢杆菌量多,种类也较多;球菌数量少,种类比较单一,主要是乳球菌类;无芽孢杆菌主要是醋酸杆菌和乳酸杆菌。

姚万春^[11]等系统地研究了泸州老窖国窖曲不同层次间微生物数量、种类和优势种群差异及规律。结果表明,国窖曲层次间微生物数量、种类和优势种群差异较大,其中曲侧表层和曲包表层微生物数量多,以霉菌为主,微生物种类少,优势菌是根霉;曲包心、曲心、曲底表层微生物数量少,以细菌为主,优势菌为芽孢细菌,微生物(主要是细菌)种类较多;青霉和犁头霉主要分布在曲底层;黄曲霉、红曲霉、酵母菌均匀分布在曲坯各层。

杨代永^[12]等对茅台高温大曲制曲发酵过程进行跟踪检测。初步分离出汉逊酵母属、假丝酵母属、毕赤酵母属等6种酵母;枯草杆菌、地衣芽孢杆菌等41种细菌;曲霉属、毛霉属、根霉属等51种霉菌。高温大曲发酵过程中的微生物总数以细菌为主,霉菌次之,酵母最少。

总之,传统生物学方法对大曲微生物的研究主要集中在基于直接镜检和平板培养的菌落计数以及影响生产的模式菌株的分离、筛选、生化鉴定上,而对各种微生物种群之间的相互作用、不同香型白酒大曲微生物群落差异、大曲微生物分子鉴定等方面的认识基本为空白。要想尽可能全面地了解大曲酒酿造系统中的微生物种类,应当探索新的技术方法和手段。

2.2 现代生物学方法

随着人们对微生物生存状态的研究深入,发现用分子生物学的方法对大曲中主要菌种进行分子鉴定,是一种快速、简便和有效的方法。分子生物学技术的发展使微生物学研究从可培养技术转向了未培养分析法。

张文学^[12,13]等应用DGGE(变性梯度凝胶电泳)研究了泸州老窖发酵过程中酒醅细菌和真菌群落结构变化规律。*Lactobacillus acetotolerans*在整个发酵过程中处于优势地位。真菌多样性随着发酵过程的进行而不断降低。

褚学英^[14]等采用添加去氧胆酸钠的选择性培养基,从大曲中分离获得了7株酵母菌纯培养。以NL1和NL4为引物,对分离得到的酵母菌进行了26S rDNA D1/D2区域序列扩增、同源性比较和系统发育分析。研究表明,6株分离酵母菌与GenBank数据库中已知酵母有较高的相似性和相近的亲源关系,如DQY-1与*Saccharomyces cerevisiae*;DQY-2与*Pichia deserticola*;DQY-3与*Zygosaccharomyces bailii*;DQY-4与*Debaryomyces hansenii*;DQY-5与*Candida pseudolambica*;DQY-6与*Endomyces fibuliger*。另外1株酵母菌DQY-7与*Uncultured fungus clone FS10*有较高的相似性,而与已知酵母

菌相似性较低,说明大曲中还存在一种以前尚未被认识的酵母菌。

高亦豹采用 PCR-DGGE 研究了大曲中微生物的群落结构^[15]。通过 PCR 扩增细菌 16S rRNA V3 区基因, DGGE 后获取了不同工艺大曲细菌微生物群落结构。此研究也首次基于未培养方法揭示了乳酸菌在大曲中的多样性及优势性,共检测到 *Weissella cibaria*、*L.helveticus*、*L.fermentum*、*L.panis*、*L.pontis* 等多种乳酸菌,且乳酸菌在细菌群落中处于优势地位。同时 DGGE 检测到了传统培养方法未检测到的嗜麦芽窄食单胞菌、假单胞菌、葡萄球菌及高温放线菌。基于大曲酵母 26S rRNA D1 区基因的 DGGE 研究显示 *Saccharomycopsis fibuligera*、*Pichia anomala* 普遍存在于所有大曲中,且在整个酵母群落中处于优势地位,弥补了传统培养方法在反应优势菌群分布方面的缺陷。真菌 18S rRNA 的 DGGE 图谱显示真菌 18S rRNA DGGE 多样性明显低于细菌和酵母多样性,且单粮曲真菌多样性均低于杂粮曲。犁头霉及米根霉在真菌 DGGE 图谱中显示出明显的优势地位。除犁头霉、米曲霉及烟曲霉以外,利用 18S rRNA 引物还检测到了 *Candida tropicalis*、*Candida allociferrii*、*Saccharomyces bulderi* 等酵母。

罗惠波^[16]等通过 PCR-SSCP(PCR-单链构象多态性)分析了浓香型大曲发酵过程中 7 个曲样中真核微生物群落的变化情况,结果表明,在大曲发酵过程中,微生物群落结构复杂,变化多样,不同微生物群落之间具有协同和相互制约的复杂生态学效应,并与外界因素相互作用,共同对大曲发酵过程产生影响。大曲发酵过程中温度的升高,对真核微生物多样性的影响较大。

李浩^[17]等采用 BIOLOG 微平板技术对浓香型大曲微生物多样性进行了研究。通过实验表明,应用 BIOLOG 技术可以明确反映大曲微生态的情况。与传统的平板计数法相比,可以更加有效地反映大曲微生物的活性。BIOLOG ECO 微平板通过微生物对单一碳源的利用来了解其微生物的动态,微生物对碳源的利用能力是表征微生物生长情况的主要指标^[18]。因此,BIOLOG ECO 微平板可以用于估价微生物群落代谢多样性和功能多样性的研究^[19]。微生物多样性与物种的丰富度及均匀度相关,群落内组成的物种越丰富、均匀度越大,则该群落的多样性越高。群落多样性和均匀度是间接反映群落结构和功能的重要特征,通过 BIOLOG ECO 微平板测定,可以反映群落的稳定性和群落的组成结构,这样可以更好地反映大曲微生态的状况。

秦臻^[20]等建立了一种基于生物标记物表征大曲类固态发酵体系微生物群落结构的生物化学方法。以微生物

细胞膜的特征组分磷脂脂肪酸(PLFAs)组成信息为指标,描述大曲微生物群落结构特征;采用麦角甾醇标记物含量估算出样品真菌生物量。结果显示,5 种不同生产工艺的大曲样品中共检出 18 种磷脂脂肪酸,优势 PLFAs 是 16:0、18:2 ω 6,9 和 18:1 ω 9, 占总 PLFAs 物质的量的 90% 以上。从 PLFAs 组成特征判断 5 类大曲中优势菌群均为真菌。基于麦角甾醇含量与真菌生物量的关联性,估算出绝干大曲中的真菌生物量分布在 (110.45 \pm 4.60)~(218.47 \pm 11.19) μ g/mg。

黄祖新利用宏基因组学对大曲酒微生物进行了研究^[21]。宏基因组学是一种不依赖于人工分离培养的微生物基因组技术,是从特定环境中直接分离所有微生物(全部细菌和真菌基因组)的 DNA,选择合适的载体用于克隆 DNA 片段,将 DNA 片段克隆到宿主细胞中进行表达,根据某些生物活性功能或基因序列筛选有价值的克隆和功能分析^[22]。利用宏基因组学技术可以直接从基因水平上研究大曲酒生产微生物群落,研究发酵过程中微生物群落的消长及变化,特别是对大曲酒微生物群落的功能及多酶体系的认识,全面了解大曲酒微生物群落的代谢机理以及形成大曲酒与众不同的香味组分的构成和风味特征。

3 结语

目前,人们对大曲微生物的研究基本上还处于传统的生理生化研究阶段,借助于分子生物手段等先进方法的相对较少。要想真正弄清白酒大曲的微生物本质,必须借助于先进的理论和先进的方法,如引入微生态、代谢工程、生物工程、发酵工程等理论以及分子生物学的方法,才能更好促进白酒的发展,使白酒生产实现质的提高。

参考文献:

- [1] 章克昌.酒精与蒸馏酒工艺学[M].北京:中国轻工业出版社,2004:434.
- [2] 杨代永,范光先,汪地强,等.高温大曲中的微生物研究[J].酿酒科技,2007(5):37-38.
- [3] 吴生文,张志刚,李旭晖,等.大曲微生物在大曲酒生产中的研究开发现状及发展前景[J].中国酿造,2011(5):8-12.
- [4] 惠丰立,柯涛,褚学英,等.大曲中酵母菌种群结构及多样性分析[J].食品与生物技术学报,2009,28(1):102-106.
- [5] 刘鸿,方尚玲,陈茂彬,等.大曲中放线菌和青霉产酶初探[J].酿酒,2010,37(2):38-41.
- [6] Th. Warscheid, J. Braams Biodeterioration of stone: a review[J]. International Biodeterioration & Biodegradation.2000,46(4):343-368.
- [7] 王忠彦,彭追远,门芸,等.高温大曲微生物区系的初步研究[J].酿酒科技,1995(3):66-67.

- [8] 施安辉,王春荣.浓香型酒大曲中细菌的分布及主要产酸细菌的鉴定[J].山东食品发酵工业,1996(4):20-23.
- [9] 施安辉,关纪奎,张文璞,等.徐坊大曲的微生物区系及其优势菌的鉴定[J].酿酒科技,2001(6):26-28.
- [10] 廖建民,姚万春,唐玉明,等.浓香型曲药细菌初步分类鉴定研究[J].酿酒,2001,28(5):42-43.
- [11] 姚万春,唐玉明,任道群,等.泸州老窖国窖曲曲坯层间微生物差异研究[J].酿酒,2005,32(5):35-37.
- [12] Zhang WX,Qiao ZW,Shigematsu T,et al.Analysis of the bacterial community in Zaopei during production of Chinese LuZhou-flavor liquor[J].Journal of the institute of Brewing, 2005,111(2):215-222.
- [13] Zhang WX,Qiao ZW,Tang YQ,et al.Analysis of the fungal community in Zaopei during the production of Chinese Luzhou-flavour liquor[J]. Journal of the Institute of Brewing, 2007,113(1):21-27.
- [14] 褚学英,惠丰立,李晓辉,等.大曲中主要酵母菌的分子鉴定[J].中国酿造,2008(5):27-29.
- [15] 高亦豹.PCR-DGGE 研究中国白酒大典中微生物群落结构 [D].无锡:江南大学,2010.
- [16] 罗惠波,黄治国,李浩,等.浓香型大曲原核微生物群落的 PCR-SSCP 解析[J].微生物学报,2009,36(9):1363-1367.
- [17] 李浩,罗惠波,侯华,等.采用 BIOLOG 微平板技术研究浓香型大曲微生物多样性[J].酿酒,2009(1):54-56.
- [18] KENNEDY A C, SMITH KL. Microbial diversity and sustainability of agricultural soils[J]. Plant Soil, 1995, 23(2): 69-79.
- [19] GARLAN J L, MILLS A L. Classification and characterization of heterophilic microbial communities on the basis of patterns of community-level sole-carbon-source utilization[J]. Appl Environ Microb, 1991, 57: 2351-2359.
- [20] 秦臻,郑佳,彭昱雯,等.生物标记法剖析传统酿造用大曲微生物群落结构[J].食品科学,2011,32(11):165-170.
- [21] 黄祖新.宏基因组学及其在大曲酒微生物研究中的应用[J].酿酒科技,2009(10):17-21.
- [22] Handelsman J, Rondon MR, Brady SF, et al. Molecular biological access to the chemistry of unknown soil microbes: a new frontier for natural products[J]. Chemistry Biology, 1998, 5(10):245-249.

白云边酿造生产坚持以质取胜硕果累累

本刊讯:长期以来,湖北白云边酒业股份有限公司始终坚持把稳定和提高原酒质量,作为稳定和提高成品酒品质的根本措施和重要保障。在公司决策层的坚强领导下,各部门以强有力的执行力,坚持上一道工序为下一道工序服务的质量管理原则,从原辅料(优质高粱、优质纯小麦等)进厂、用水、制曲、原酒酿造及窖池保养的每一道工序操作都严格把好质量关。在公司技术部门密切配合下,酿造车间在生产实践中坚持传承与创新质量管理,取得累累硕果。十多年来,白云边原酒品质稳定提高,一级品率逐年上升。2010~2011 酿造年度结束后,为了让白云边原酒更香、品质更优、一级品率再上新台阶,公司技术质量部与酿造车间等部门召开年度生产工艺动态分析会,会议根据酿造车间多年来各轮次产酒质量、产量与粮醅、酒醅化验数据的相关性,经过科学对比与论证,在 2011~2012 酿造年度提出“限产提质”(通过修订生产工艺参数,达到限定粮曲总出酒率,稳定和提高原酒一级品率的目标)的酿造指导思想,同时对白云边酿造生产工艺参数、各轮次出酒比率做了更为科学合理的微调。9月下旬,随着酿造车间第十轮操作丢糟结束,白云边 2011~2012 长达一年的原酒酿造圆满收官。据悉,酿造车间 2011~2012 年度实行“限产提质”后,原酒一级品率又创历史新高。

代表企业核心竞争力之一的白云边酿造工艺,吸收了“酱香型”白酒的工艺精华——高温曲、高温堆积和“浓香型”白酒的工艺精华——混蒸续渣、泥窖发酵,将二者的特点创造性地完美融合,经过多年的探索与发展,自成体系。在白酒界,浓酱兼香型白酒的诞生和发展,堪称中国白酒工艺传承、技术创新、发展与白酒多样性的典范。1991 年 10 月,白云边首创的浓酱兼香型白酒以其“芳香优雅,酱浓协调,绵厚甜爽,圆润怡长”的独特风格和卓越品质,被国家轻工部确立为浓酱兼香型白酒的典型代表。2009 年 12 月 1 日,以白云边公司为第一起草单位,以中国酿酒大师、白云边总工程师、浓酱兼香型白酒缔造者熊小毛为第一起草人的《浓酱兼香型白酒国家标准》(GB/T23547—2009)颁布实施以来,白云边以标杆企业的责任和担当,引领全国兼香型白酒企业认真贯标,规范化生产,不断促进兼香型白酒产品质量的稳定提高,受到业内外好评。白云边严格遵守《产品质量法》、《食品安全法》等国家法律法规,依托自身强大的技术平台与雄厚的科研实力,致力于兼香白酒技术攻关与工艺优化创新,始终走在兼香型白酒技术的最前列。为了巩固中国浓酱兼香型白酒的王者地位,白云边高举兼香型旗帜,坚定不移地走质量效益型发展道路,坚决践行“以质取胜、质量至上”企业质量文化,全员牢固树立起“质量是企业的生命、质量管理是企业的生命线”的观念,坚持不懈地开展质量管理工作,加强企业质量管理的基础工作,广泛开展全员质量教育和培训,实现全员、全过程、全方位的质量管理。近年来,白云边酿造、制曲等部门有多项群众性质量改进成果获评“省优”、“国优”QC 成果。

截至 2012 年 11 月 4 日,白云边 2012~2013 酿造年度为期 45 天的第一、二次大投料(优质高粱、纯小麦制优质高温曲)圆满结束。为期 30 天的第三次投料(优质高粱粉、纯小麦制优质中温曲)要到 2013 年 4 月中旬的第八轮操作中进行。11 月 5 日清晨,白云边生态酿酒园美酒飘香,酿造车间进入 2012~2013 年度为期 30 天的第三轮操作第一次取酒阶段。与往年一样,2012~2013 年度酿造车间严格实行全员绩效考核,实行质量末位淘汰制,大力推进 6S 现场管理。2012~2013 酿造年度第一、二次大投料期间,在公司与酿造车间领导及工艺组的齐抓共管下,全体酿造人齐心协力,贯彻执行“限产提质”的酿造指导思想,严格按工艺标准精细化操作,把好每一道酿造质量关,进一步提高了白云边关键工序粮醅高温堆积的质量。公司技术质量部的化验数据显示,各酿造班粮醅及酒醅的各项理化指标均符合工艺要求。2012~2013 酿造年度进入第一次取酒以来,白云边各酿造班严格按工艺要求做好了出窖酒醅的分层取酒、掐头去尾、量质摘酒、按质并坛入库,同时合理掌控好粮醅的糊化度、糖分、水分、酸度,能将酱香中略带粮香味的第一、二次酒的出酒率限定在工艺要求内,确保在品质绝佳的第三、四、五次酒迎来自出酒的高峰,为 2013 酿造年度丰产优质原酒奠定了坚实基础。(邹昌平)