

我国白酒酿造微生物多样性的研究现状及展望

谭映月 胡 萍 谢 和

(贵州大学生命科学学院, 贵州 贵阳 550025)

摘要: 对我国白酒酿造微生物多样性的研究现状进行了综述。对比了不同酿造区系、地域环境、香型种类以及不同检测技术中酿酒微生物菌群结构及其消长规律的差异,总结了现阶段存在的问题并进行了展望,对进一步研究微生物代谢机制与酒体风味形成之间的关系奠定了基础。

关键词: 白酒酿造; 微生物; 多样性; 现状及展望

中图分类号: Q93-3; TS262.3; TS261.1

文献标识码: A

文章编号: 1001-9286(2011)11-0100-06

Present Research Status and Prospects of the Diversity of Liquor-making Microbes in China

TAN Yingyue, HU Ping and XIE He

(College of Life Sciences, Guizhou University, Guiyang, Guizhou 550025, China)

Abstract: The present research status of the diversity of liquor-making microbes in China was reviewed. The difference in liquor-making microflora structure and their growth and decline rules for liquor produced in different regions, of different liquor flavor types, and by different analytic technology was compared. And the existing problems at present were introduced, which could provide reference for further research on the relations between microbial metabolism mechanism and the formation of liquor body and liquor flavor.

Key words: liquor-making; microbes; diversity; present status and prospects

在我国传统酿酒工艺中,酒曲、酒醅和窖泥等酿造区系孕育出丰富的微生物资源,同时又是生产优质白酒的直接原料。这些微生物可催化原料进行一系列复杂的生化反应,能分解淀粉、脂肪形成糖和氨基酸引发美拉德反应,生成酱香型白酒独特的风味前驱物^[1]。分解蛋白质为小分子肽,最终形成醇、醛、酮、酯等白酒重要的香气成分,从根源上影响酒体品质^[2]。但由于酿酒的地域分布、生态环境和加工工艺等方面的差异使酿造微生物多样性也不尽相同,从而呈现出独特的白酒香型。

因此,研究酿酒微生物区系的多样性及其消长规律,是弄清微生物代谢与白酒呈香机制的首要任务。笔者就近年来对酿酒微生物种群结构、分布状况和衍生交替的研究进行了综述,对比了传统分离培养手段和现代分子生物学技术在酿酒菌群多样性分析中的优缺点,探讨了现阶段的不足并提出了改进,对发掘和利用酿酒微生物资源,调控白酒加工工艺参数,改善酒体品质,提高白酒的商品价值有重要意义。

1 白酒酒曲微生物多样性的研究现状

酒曲作为白酒酿造的原动力,直接影响酒体品质。根据制曲温度,可分为高温、中高温和中温大曲。高温和中高温大曲多用于酿造酱香型白酒,而浓香型和清香型白酒多以中温大曲发酵。不同种类的大曲微生物类群和数量存在较大差异,浓香型酒曲细菌总数、常温分解菌和产酸菌大体上高于酱香型大曲,而芽孢菌和嗜热菌的数量则是酱香型酒曲较多^[3]。

1.1 浓香型白酒酒曲微生物多样性

浓香型白酒酒曲的研究报道较多,主要可分为两类:一是利用传统分离培养技术分析曲块不同层次间菌群的分布,曲药发酵过程中微生物种类数量的变化以及比较不同地域、季节生产的酒曲菌群的相关性和差异性。二是利用现代生物技术研究菌群消长规律,从分子水平上分析微生物的系统发育地位,绘制遗传图谱,提高了研究的准确性。

1.1.1 传统技术分析浓香型酒曲菌群多样性

基金项目:黔科合茅科联字(2009)7003。

收稿日期:2011-09-21

作者简介:谭映月(1988-),女,硕士研究生,研究方向:食品营养与食品微生物。

优先数字出版时间:2011-10-17;地址:<http://www.cnki.net/kcms/detail/52.1051.TS.20111017.1043.004.html>。

传统技术多采用平板分离培养,菌落计数和生理生化实验鉴定菌种等手段来研究浓香型酒曲微生物的分布情况、消长规律及地域生态环境对菌群的影响,取得了较多的成果。

从静态差异的角度来看,曲块各层次之间微生物数量、种群以及优势菌群都存在差异。纵向观察,曲块由上至下微生物总数呈下降趋势,表层以霉菌为主,中心和底层以细菌居多,而酵母菌在酒曲各层次分布较少^[4-5]。从动态差异角度来看,制曲过程大致可分为低温培菌期、高温转化期、后火生香期和储存期。培养期各类微生物急剧增加,其中霉菌是优势菌群,随着温度的升高和水分氧气的减少抑制了霉菌、酵母和不耐热好氧细菌的生长,嗜热芽孢菌生长旺盛。生香期,营养基质的消耗和次生代谢产物的积累使总菌数继续减少,芽孢菌产生芽孢。储存期,菌体死亡率高于繁殖率,菌数呈最少状态^[6-7]。同样,不同地域环境和季节产出的大曲,各种理化性质和菌群都有明显区别。其中,泸州老窖国窖曲中霉菌以根霉属(*Rhizopus*)为主,芽孢杆菌属(*Bacillus*)是细菌优势菌,而云南沧州霉菌的优势菌群是青霉菌属(*Penicillium*),细菌以无芽孢杆菌为主^[4-5]。余有贵^[8]比较了四川泸州大曲和湖南邵阳大曲发现,邵曲曲皮曲心的细菌和霉菌数均多于泸曲,其中霉菌数在发酵2~5 d时出现显著差异。随后,李祖明^[9]等人对甘肃皇台酒曲和湖南德山酒曲对比发现,皇台大曲微生物总数高于德山大曲,且酵母菌最明显,这对酒体相应的理化性质有一定程度的影响。游剑^[10]等人比对了春季和夏季酿造用的枝江大曲,发现夏季的枝江大曲细菌、酵母和霉菌数均高于春季大曲。

1.1.2 现代分子技术分析浓香型酒曲菌群多样性

近年来,国内外多用于分析土壤^[11]、海洋^[12]、湖泊^[13]、发酵食品^[14-15]等复杂环境微生物多样性的分子生态学技术,在酿酒微生物多样性的研究中有了逐步的应用。其中,以16S rRNA序列同源性分析,PCR特异性扩增与SSCP、DGGE和TGGE等分子指纹图谱技术的联用为主,对浓香型酒曲微生物种群结构、遗传多样性及系统发育地位进行了较多分析,发掘出传统技术不能培养的微生物菌群,并通过克隆测序等技术把优势菌群鉴定到种,更加直观、准确地分析酒曲微生物多样性。

浓香型酒曲中细菌呈现高度的多样性,其中胡佳^[16]和孟镇^[17]等人分别利用16S rRNA序列同源性分析和PCR-DGGE技术对泸州老窖和山东某浓香型白酒曲药中细菌种群结构和进化多样性进行分析,均发现了不可培养的细菌类群,并通过建立系统发育树发现,泸州老窖曲药细菌分属于代尔夫特菌属(*Delftia*)、变形杆菌属(*Proteobacterium*)、假单胞菌属(*Pseudomonas*)等7个菌

属,而山东浓香型酒曲细菌主要属于厚壁菌门(*Firmicutes*),包括乳杆菌科(*Lactobacillaceae*)和芽孢杆菌科(*Bacillaceae*)等。由于地域环境和检测手段等因素的不同,得到的结果也存在差异,其中泸州老窖曲药优势菌群为假单胞菌属(*Pseudomonas*),而山东浓香型酒曲细菌多为乳杆菌属(*Lactobacillus*)和芽孢杆菌属(*Bacillus*),并发现了酒醅发酵后期的优势菌乳酸片球菌(*Lactobacillus manihotivoran*)。同样,真核微生物数量和种类也在浓香型酒曲发酵过程中不断变化。罗惠波^[18]等人利用PCR-SSCP分析泸州老窖“久香”牌包包曲中真核微生物在发酵不同时期的丰度、优势度、多样性及其相似性发现,在发酵过程中,菌群结构相似,但其优势度和多样性差异很大。这就表明,在不同发酵时期优势菌群变化显著,这可能是由于温湿度和环境的改变以及不同微生物菌群之间的相互制约作用,使得真核微生物在大曲的发酵过程中存在演替现象。此外,Facultad de Ciencias Quimicas^[19]等人还利用PCR-TGGE结合异源双链分析技术(Heteroduplex Analysis, HA)对酿酒酵母的种内间差异进行了分析。

1.2 酱香型白酒酒曲微生物多样性

国酒茅台由于其得天独厚的生态环境、独特的生产工艺和浓郁的酱香风味成为酱香型白酒的典范,亦是研究的主要对象。目前的研究还是大多采用传统手段研究酱香型高温大曲主要菌群及其演变规律。

高温制曲是茅台酒特殊的工艺之一,制曲温度可高达60~62℃^[20],为耐高温微生物提供了良好的生长环境。杨代永^[21]等人从茅台高温大曲中初步分离得到98种微生物,其中细菌41种,多为芽孢杆菌属(*Bacillus*),酵母菌6种,霉菌51种包括曲霉属(*Aspergillus*)、毛霉属(*Mucor*)等。Chang-lu Wang^[22]等人通过检测茅台大曲不同层次之间以及大曲发酵过程中微生物菌群动态变化发现,从酒曲层次来看,好氧性细菌多分布在大曲表面和边缘,嗜温性细菌多存在于曲心,而发酵初期,酵母菌在大曲表面迅速生长,后期只能在曲心中少量检出。对霉菌来说,根霉属分布在曲表面,木霉属多分布在曲中层,曲霉属多在曲心。在制曲过程中,发酵前5天,细菌、酵母、霉菌的数量均显著增加,从第10天开始有所下降。其中酵母菌数在第10天达到最大值58.3 cfu/g,随后被霉菌取代,霉菌成为发酵中后期的优势菌群。由于很难模拟高温制曲的极端环境,仅凭能培养出的微生物很难说明微生物区系的组成情况。因此,高亦豹^[23]等借用PCR-DGGE技术分别对酱香型高温大曲和浓香型中温大曲细菌多样性进行了分析,发现了无法培养的木糖葡萄球菌(*Staphylococcus xylosus*)和产酸克雷伯菌(*Klebsiella*

oxytoca) 以及耐高温的高温放线菌属(*Thermoactino-myces sanguinis*)。

1.3 清香型白酒酒曲微生物多样性

清香型白酒微生物的研究多偏重于分析酒醅中主要微生物菌群结构及功能菌的筛选,而对酒曲微生物的报道甚少。1992年,李增胜^[24]通过研究汾酒大曲发酵过程中微生物的动态发现,大曲中的酵母、霉菌较多,随着发酵的进行,其种类和数量不断减少,作为优势细菌的乳杆菌也逐渐被乳球菌所取代,而醋酸菌的数量有大幅增加。

2 白酒酒醅微生物多样性的研究现状

酒醅复杂的微生物区系是酿酒微生物多样性研究的重点,发酵过程中微生物代谢产生大量的酶类,引发一系列生化反应,是形成酒体风味物质的直接来源。近年来,对泸州老窖、五粮液等知名浓香型白酒的糟醅微生物研究比较深入,能熟练运用 DGGE 等指纹图谱技术追踪酒糟微生物区系的动态变化,对酱香型酒醅微生物的研究还停留在传统手段上。此外,对凤香型和芝麻香型白酒糟醅菌群结构有了初步的探讨。

2.1 浓香型白酒糟醅微生物多样性

在糟醅微生物研究历程中,浓香型白酒实现了从传统到现代的跨越式发展。特别是近年来,以张文学为主的专家学者们利用 PCR-DGGE 和克隆等现代分子生物学技术研究了浓香型白酒糟醅中原核和真核生物的区系组成及动态变化,将传统手段与分子手段进行了比较,对比了不同地域产出的浓香型白酒酒醅中微生物的异同。

从酒醅微生物分布和消长的总体情况来看,细菌多分布在上层酒醅,酵母多分布在下层酒醅,霉菌较少。发酵初期,好氧细菌、兼性厌氧细菌、酵母菌和霉菌的数量都急剧增加。随着发酵的进行,各菌数均有减少,细菌和酵母菌在发酵中期交替成为优势菌群,临近出窖时,酵母菌的数量减少,芽孢杆菌数增加,霉菌到后期基本上已不能检出^[25-26]。从微生物类群来看,通过 16S rRNA 序列同源性比较,发现窖内发酵 60 d 的糟醅中原核生物可分为 6 类真细菌和以甲烷囊菌属(*Methanoculleus*)、甲烷螺菌属(*Methanospirillum*)为主的古细菌^[27]。利用传统培养和 PCR-DGGE 结合跟踪泸州老窖窖内中层中心,以及中层四周的糟醅在发酵 0~10 周期间细菌的消长变化发现,入窖时细菌的多样性高,检测出 11 个细菌菌属,而发酵 7 d 后多样性减少,嗜酸乳杆菌(*Lactobacillus acidophilus*)逐步成为优势菌群^[28]。发酵 4 周后,散囊菌属(*Eurotium*)和曲霉菌属(*Aspergillus*)逐渐成为主要菌群。而被认为广泛存在的酵母属(*Saccharomyces*)仅在发酵 1 周后的中层边缘被检测到有微量存在,说明其在泸州老

窖酿造过程中并不是主要功能菌^[29]。用传统方法鉴定出细菌 6 个属,PCR-DGGE 技术鉴定出 11 个属,两种方法都显示乳杆菌属(*Lactobacillus*)为糟醅优势菌,说明更多细菌菌群特别是优势菌和不能培养的菌可以通过分子手段检出。

不同的酿酒生态环境孕育的酿酒微生物之间也存在差异。与泸州老窖相比,同为浓香型的全兴酒和贵州习酒,酒糟醅中的优势细菌也为乳杆菌属(*Lactobacillus*),而宜宾多粮浓香型白酒酒糟中,芽孢杆菌属(*Bacillus*)为主要菌群^[30]。另外,全兴酒的优势真菌类除伊萨酵母属(*Issatchenkia*)、曲霉菌属(*Aspergillus*)与泸州老窖一样,还检出酵母菌属(*Saccharomyces*)、复膜孢子酵母属(*Saccharomycopsis*)、犁头霉菌属(*Absidia*)^[31]。而在贵州地区盛夏酿造的习酒中,发酵初期的一类优势菌属于非培养细菌,并检出多分布在发酵食品和土壤中的魏斯氏菌属(*Weissella*)^[32]。另外,王海燕^[33]等人比较了同一地区生产的不同香型(浓香型和芝麻香型)白酒酒醅细菌多样性发现,2 种香型白酒酒糟细菌多样性都随着发酵时间的延长而下降,而浓香型酒糟醅在发酵 12 d 左右出现明显的优势菌群,芝麻香型则在第 5 天出现 2 种优势菌。并且 2 种香型酒糟的细菌群落结构差异很大,浓香型酒糟细菌以乳酸杆菌属(*Lactobacillus*)为主,而芝麻香型则以芽孢杆菌属(*Bacillus*)占优势。

2.2 酱香型白酒糟醅微生物多样性

与浓香型白酒不同,酱香型酒醅可为分高温堆积酒醅和窖内发酵酒醅,其独特的工艺造就了特殊的酒醅微生物区系,也增加了研究的难度。目前研究多集中于采用传统手法对堆积和窖内酒醅中微生物种类和数量的变化进行分析,而传统培养很难准确地模拟其复杂的发酵环境,对微生物的分离培养带来了一定的困难,在分子水平上分析酱香型酒糟醅微生物多样性的研究还未见报道,这也为现代分子技术在酱香型酒糟醅菌群多样性的应用提供了平台。

对酱香型白酒来说,由于高温制曲使酵母菌大量死亡,而堆积工艺相当于二次制曲,能够网罗生产环境中大量的微生物从而增加菌群的多样性。国酒茅台酒醅堆积期间,酵母菌数急剧上升,细菌数相应下降,且随着轮次的增加,菌群总数逐渐下降。而窖内发酵期间,细菌和酵母菌数均不断减少,其中乳酸菌在出窖时难以检出^[20]。由于堆积温度在 50℃左右,极端酿造环境中的微生物多属于中温嗜热菌^[34]。其中,细菌以芽孢杆菌属(*Bacillus*)为主,包括地衣芽孢杆菌(*Bacillus licheniformis*)、巨大芽孢杆菌(*Bacillus megaterium*)、枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*),同时还有葡萄球菌属(*Staphylococcus*)、土壤杆

菌属 (*Agrobacterium*) 等。酵母多属于假丝酵母 (*Candida*)、酵母属 (*Saccharomyces*)、裂殖酵母属 (*Schizosaccharomyces*)。而在窖底、窖面或窖泥的微生物多产乙酸的甲烷共生梭菌属 (*Clostridium*)^[35]。茅台技术中心还对堆积中“腰线”形成过程中微生物的变化作了研究,细菌种类和数量比例下降,酵母种类和数量增加,霉菌种类和数量都较少,以黄曲霉、根霉为主^[36]。酱香型白酒酒醅微生物与茅台酒醅微生物变化趋势大体相同,堆积期酵母菌(可初步分为五大类)^[37]和非芽孢细菌数量增多,霉菌数减少,且不同轮次对微生物影响很大^[38]。窖内发酵期,细菌总数下降,上中层酒醅酵母菌下降,中期有一个小幅回升,而下层酵母数先迅速增加后缓慢降低,霉菌数下降,中后期有所回升之后就保持稳定^[39]。

2.3 清香型及凤香型白酒糟醅微生物多样性

对清香型和凤香型白酒酒糟微生物的研究报道较少,还处于初期探索阶段。清香型汾酒的酿造实质是酵母、霉菌、细菌相互作用的过程,酵母以产酒精能力强的酵母菌属 (*Saccharomyces*) 为主,霉菌主要有犁头霉属 (*Absidia*)、根霉属 (*Rhizopus*)、毛霉属 (*Mucor*)、曲霉属 (*Aspergillus*),细菌以乳酸菌 (*Lactobacillus*)、醋酸菌 (*Acetic bacteria*)和芽孢杆菌 (*Bacillus*)为主,而细菌的大量繁殖会引起酸败^[40]。童敏江^[41]等人通过模拟汾酒发酵条件,筛选出的酿酒主要功能菌多为酵母和细菌。此外,汾酒酒醅(大渣和二渣)发酵过程中微生物变化过程也存在异同,两者均出现“二次生长”。但在发酵初期,大渣中乳酸菌数多于二渣,且有少量霉菌。二渣发酵过程中没检出霉菌,发酵中期,二渣酵母数又高于大渣,发酵后期,大渣中主要是细菌增加。二渣中除了细菌,酵母菌也增多^[42]。贡娟莉^[43]等人研究了凤香型太白酒生产发现,在微生物种群和优势菌方面与其他香型白酒没有太大差异,不同的是凤香型酒糟中还存在大量放线菌,特别是发酵末期中层酒醅的放线菌数最多。

3 白酒窖泥微生物多样性的研究现状

浓香型白酒属于传统的泥窖固态发酵模式,形成了窖泥、酒曲、酒糟醅多菌系微生物协同共酵、拮抗竞争的微生态环境,而窖泥中以厌氧菌为主。近年来,对浓香型窖泥不同窖龄、不同部位、不同层次、不同地域和不同季节发酵的菌群多样性的研究已经成为重点。

窖泥中的微生物以细菌为主,有乳酸菌、丁酸菌、己酸菌、甲烷菌、硫酸盐还原菌、硝酸盐还原菌等,同时含有一定量的放线菌^[44]。在固、液、气多相发酵体系中相互作用形成独特的产香系统。发酵年限的增加伴随了微生物繁衍交替的过程,使得老窖泥微生物多态性高于新窖泥。

而窖泥从上至下大可分为封顶泥、窖壁泥和窖底泥,由于它们的水分、pH值、有机质含量等理化指标各异,导致不同部位窖泥菌群多态性也存在差异。随着使用排次的增加,封顶泥中除厌氧性芽孢细菌逐渐递增外(使用5排的封顶泥的嫌气厌氧芽孢细菌数量是起始泥的1.75倍),其余细菌、酵母、霉菌和放线菌均呈下降趋势(使用2排次的封顶泥几乎检不出酵母和放线菌),而窖壁泥和窖底泥的微生物种群和数量却呈不断扩增趋势^[45-46]。此外,邓依^[47]等人利用16S-23S rRNA ITS-AFLP(扩增片段长度多态性)对比了新老窖池中窖壁泥和窖底泥原核微生物后发现,老窖窖壁泥与新窖窖壁泥菌群结构相似度高,相似系数为1.00,而老窖窖底泥与新窖窖底泥原核微生物差异很大。

同样的窖泥不同层次间,菌群分布也不尽相同,表层窖泥微生物种类和数量明显高于深层窖泥。而不同窖龄的窖泥对窖池酒糟醅微生物的分布也有一定的影响,用老窖泥发酵的酒糟醅中菌群多样性高于用新窖泥发酵,且酒糟醅上、中、下层微生物分布递增,上中层以硫酸盐还原菌占优势,下层以产甲烷和己酸菌为主^[48]。

受季节调控的天气状况对酿造环境也有一定影响,会造成微生物消长变化的差异。对枝江大曲春季和夏季出窖窖泥菌群变化分析发现,春夏季窖泥中细菌优势菌群包括醋杆菌属 (*Acetobacter*)、节杆菌属 (*Arthrobacter*)、芽孢杆菌属 (*Bacillus*)、梭菌属 (*Clostridium*)、肠杆菌属 (*Enterobacter*)、乳杆菌属 (*Lactobacillus*)、芽孢乳杆菌属 (*Sporolactobacillus*)和假单胞菌属 (*Pseudomonas*)。酵母有红酵母属 (*Rhodotorula*)和酒香酵母属 (*Brettanomyces*),霉菌有曲霉属 (*Aspergillus*)、毛霉属 (*Mucor*)和青霉属 (*Penicillium*)。放线菌以链霉菌属 (*Streptomyces*)为优势菌群^[10]。

4 存在问题及展望

4.1 存在问题

4.1.1 从研究对象来看,在白酒酿造过程中,酒曲、酒糟醅和窖泥等复杂环境是研究的主体,对厂房空气和酿酒用水中微生物多样性研究比较欠缺。

4.1.2 从研究类型来看,对我国浓香型白酒酿造微生物多样性的研究较多,酱香型次之,清香型、凤香型和芝麻香型等白酒则很少。而不同香型白酒微生物区系又存在差异,使得酿酒微生物资源得不到充分认识和利用。

4.1.3 从研究技术来看,传统技术仍占主要地位,由于培养基质的吸附、包埋、杂质干扰和难培养微生物的存在以及传统技术耗时耗力等缺点,使得实验结果缺乏一定的准确性。而微生物分子生态学技术虽然在近年来得到逐

步应用,但是技术种类比较单一,多以分子指纹图谱联合克隆测序技术为主,且这些技术本身也存在一定的局限性。用于分析酿酒微生物多样性的 PCR-DGGE 技术会受到样品总 DNA 的提取质量、PCR 扩增条件等多方面因素的影响。它通常只能检测到占菌落数量约 1% 或以上的类群,且进行 DGGE 的核苷酸片段一般不超过 500 bp,使所提供的系统发育信息受到限制。

4.1.4 从研究内容来看,偏重于分析酿造微生物种群结构和消长规律,而对微生物间的协同、拮抗等相互作用及其复杂的代谢调控机制了解甚少。

4.2 展望

我国白酒的酿造环境是一个庞大的生态系统,孕育了种类繁多的微生物群体,在对主要酿造区系进行研究的同时也不能忽略空气和水分等环境微生物的存在。它们相互联系、相互影响,共同维系着酿酒过程的动态平衡,才能产出品质卓越的白酒。酱香型、清香型和其他香型白酒要学习和借鉴浓香型白酒酿造微生物的研究经验,加快自身酿造区系微生物多样性的分析进程,争取做到从宏观到微观、传统到分子、多学科多领域相互合作的跨越式发展。

此外,PCR-DGGE 等技术在酿酒微生物中的成功应用为更多微生物分子生态学技术的引进开创了良好的平台。针对 DGGE 等技术自身的局限性,可以利用 DG-DGGE^[49]和 CD-DGGE^[50]等优化指纹图谱的清晰度和真实度,提高实验结果的准确性。而同为 DNA 突变检测的 SSCP、RFLP 和 T-RFLP、SIP 等技术在微生物生态学中的迅速发展,同样也能应用在对白酒酿造微生物遗传多样性、群体亲缘进化关系、构建遗传连锁图、标记和定位特定功能基因的研究中。利用稳定同位素探针技术 SIP 能够分析不能培养的微生物的生物量和功能^[51-52],因此,可以将酿酒微生物的功能和菌群结构联系起来。此外,高通量测序^[53]和 DHPLC^[54]是近年来建立并应用于微生物多样性中的检测技术,与 DGGE、T-RFLP 等指纹图谱技术相比,能够自动化、高效快速、高通量进行检测,可以大大提高酿造微生物多样性检测的速率和准确性。在对我国白酒酿造微生物多样性的研究基础上,发掘更多宝贵的微生物资源,建立我国规模庞大的酿酒微生物资源数据库,揭开酿造微生物与白酒风味之间的神秘面纱是下一步重要的战略目标。

参考文献:

[1] 刘晓光,谢和,等.酱香型白酒风味物质的形成与微生物关系的研究现状与进展[J].贵州农业科学,2007,35(2):131-134.
[2] 张中义,畅晓霞,钟其顶.酒曲酶系、菌系特征及酿造过程中微生物动态变化[J].酿酒,2008,35(2):24-29.

[3] 吴衍庸.酒曲微生物分析与白酒香型初探[J].酿酒科技,2004(5):38-39.
[4] 姚万春,唐玉明,任道群,等.泸州老窖国窖曲曲坯层次间微生物差异研究[J].酿酒,2005,32(5):35-36.
[5] 张春山,马森,吴永安,等.云南澜沧江中温大曲中微生物初步分析[J].中国酿造,2010,216(3):84-85.
[6] 赵东,牛广杰,彭志云,等.五粮液包包曲发酵过程中微生物区系变化及其理化因子动态演变的研究[J].酿酒,2009,36(6):38-39.
[7] 王世宽,候华,张强,等.伏曲培养过程中微生物及理化指标的研究[J].酿酒科技,2009(4):39-42.
[8] 余有贵.泸州和邵阳大曲培养过程中微生物的比较研究[J].酿酒,2005,32(2):23-25.
[9] 李祖明,李玉辉,刘世云,等.皇台酒曲与德山大曲酒曲的比较研究[J].酿酒科技,2009(1):27-29.
[10] 游剑,陈茂彬,方尚玲,等.枝江大曲酒大曲和窖泥中优势菌的分离与初步鉴定[J].酿酒,2009,36(3):31-34.
[11] Lionel Ranjard, Franck Poly, Sylvie Nazaret. Monitoring complex bacterial communities using culture-independent molecular techniques: application to soil environment[J]. Res. Microbiol, 2000,(151):167-177.
[12] Zhi-yong Li, Li-ming He, Xiao-ling Miao. Cultivable bacterial community from south china sea sponge as revealed by DGGE fingerprinting and 16S rDNA phylogenetic analysis[J]. Current Microbiol 2007,(55):465-472.
[13] Young-Do Nam, Youlboong Sung, Ho-Won Chang, et al. Characterization of the depth-related changes in the microbial communities in lake hovsgol sediment by 16S rRNA gene-based approaches[J]. The Journal of Microbiology, 2008,46(2):125-136.
[14] Cinzia L. Randazzo, Sandra Torriani, Antoon D. L. Akkermans, et al. Diversity, dynamics, and activity of bacterial communities during production of an artisanal sicilian cheese as evaluated by 16S rRNA analysis[J]. Applied And Environmental Microbiology, 2002,68(4):1882-1892.
[15] Maria Laura Giannino, Marta Marzotto, Franco Dellaglio, et al. Study of microbial diversity in raw milk and fresh curd used for Fontina cheese production by culture-independent methods[J]. International Journal of Food Microbiology,2009,(130):188-195.
[16] 胡佳,邓斌,张文学,等.浓香型白酒曲药中细菌组成及系统学分析[J].酿酒科技,2007(5):17-19.
[17] 孟镇,熊正河,钟其顶,等.应用 PCR-DGGE 技术解析白酒大曲细菌群落结构[J].食品与发酵工业,2010,36(10):159-162.
[18] 罗惠波,黄治国,李浩,等.浓香型大曲真核微生物群落的 PCR-SSCP 解析[J].中国酿造,2009,209(8):42-45.
[19] S Herna "n-Go" mez, J C Espinosa, J F Ubeda. Characterization of wine yeasts by temperature gradient gel electrophoresis (TGGE)[J]. FEMS Microbiology Letters, 2000

- (193):45-50.
- [20] 郭坤亮.茅台酒酿造微生物的生物多样性成因及研究价值的探讨[J].酿酒,2002,29(2):36-38.
- [21] 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):37-41.
- [22] Chang-lu Wang, Dong-jian Shi, Guo-li Gong. Microorganisms in Daqu: a starter culture of Chinese Maotai-flavor liquor[J]. *World J Microbiol Biotechnology*, 2008, (24):2183-2190.
- [23] 高亦豹,王海燕,徐岩.利用 PCR-DGGE 未培养技术对中国白酒高温和中温大曲细菌群落结构的分析[J].微生物学通报,2010,37(7):999-1004.
- [24] 李增胜.大曲清香酒发酵过程中微生物的动向[J].酿酒科技,1992(5):25-26.
- [25] 赵东,乔宗伟,彭志云.浓香型白酒发酵过程中酒醅微生物区系及其生态因子演变研究[J].酿酒科技,2007(7):37-39.
- [26] 吕辉,张宿义,冯治平,等.浓香型白酒发酵过程中微生物消长与香味物质变化研究[J].食品与发酵科技,2010,46(3):37-59.
- [27] 张文学,向文良,乔宗伟,等.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(7):22-25.
- [28] Wen-xue Zhang, Zong-wei Qiao, Toru Shigematsu, et al. Analysis of the bacterial community in zaopei during production of chinese Luzhou-flavor liquor[J]. *Inst. Brew*, 2005,111(2):215-222.
- [29] Wen-xue Zhang, Zong-wei Qiao, Yue-qin Tang, et al. Analysis of the fungal community in Zaopei during the production of Chinese Luzhou-flavour liquor[J]. *Inst. Brew*, 2007,113(1):21-27.
- [30] 周瑞平,陈云宗,唐代云.宜宾多粮浓香型酒厂内细菌多样性及分布的研究(二)[J].酿酒科技,2010(5):60-64.
- [31] 乔宗伟,张文学,张丽莺,等.浓香型白酒发酵过程中酒醅的微生物区系分析[J].酿酒,2005,32(1):18-22.
- [32] 施思,邓宇,李波,等.DGGE 法在盛夏习酒酒醅的微生物菌群结构解析中的应用[J].酿酒科技,2010(3):51-53.
- [33] Hai-Yan Wang, Xiao-Jun Zhang, Li-Ping Zhao, et al. Analysis and comparison of the bacterial community in fermented grains during the fermentation for two different styles of Chinese liquor[J]. *Ind Microbiol Biotechnol*, 2008,35:603-609.
- [34] 黄永光,黄旭,黄平.茅台酒酿酒极端环境与极端酿酒微生物[J].酿酒科技,2006(12):47-50.
- [35] 蒋红军.茅台酒生态环境中酿造微生物多样性的研究及展望[J].酿酒,2003,30(4):22-24.
- [36] 江鹏,蒋红军,王和玉,等.酱香型白酒堆积发酵过程中“腰线”的形成机理[J].酿酒科技,2004(6):43-44.
- [37] 任道群,唐玉明,姚万春,等.酱香型酒糟醅酵母菌的初步分类及选育[J].酿酒,2007,34(6):44-46.
- [38] 唐玉明,任道群,姚万春,等.酱香型酒糟醅堆积过程温度和微生物区系变化及其规律性[J].酿酒科技,2007(5):54-58.
- [39] 唐玉明,姚万春,任道群,等.酱香型白酒窖内发酵过程中糟醅的微生物分析[J].酿酒科技,2007(12):50-53.
- [40] 李增胜,任润斌.清香型白酒发酵过程中酒醅中的主要微生物[J].酿酒,2005,32(5):33-34.
- [41] 董敏江,雷振河,李琦,等.汾酒酿造过程中主要功能微生物的筛选和研究[J].食品与发酵工业,2010,36(2):17-21.
- [42] 韩莎,雷振河,李琦,等.汾酒酿造过程中可培养微生物的群落结构与代谢规律研究[J].食品与发酵工业,2009,35(1):9-13.
- [43] 贞娟莉,颜霞,朱博,等.太白酒发酵过程中酒醅微生物区系分析[J].酿酒科技,2006(12):40-42.
- [44] 胡承,应鸿,许德富,等.窖泥微生物群落的研究及其应用[J].酿酒科技,2005(3):34-38.
- [45] 任道群,唐玉明,姚万春,等.循环利用的封窖泥微生物变化研究[J].酿酒科技,2010(12):37-44.
- [46] 余有贵,李侦,熊翔,等5人.窖泥微生态的主要特征[J].食品科学,2009,30(21):258-261.
- [47] 邓依,唐云容,张文学.16S-23S rRNA ITS-AFLP 指纹图谱分析在白酒窖泥原核微生物多样性分析中的应用[J].酿酒科技,2010(3):46-47.
- [48] 张肖克,黄永光,胡晓瑜.窖泥糟醅发酵过程微生物多态性特征[J].酿酒科技,2006(1):65-68.
- [49] Nanqi Ren, Defeng Xing, Bruce E. Rittmann, et al. Microbial community structure of ethanol type fermentation in bio-hydrogen production[J]. *Environmental Microbiology*, 2007, 9(5):1112-1125.
- [50] EDENBORN S L, SEXSTONE A J. DGGE fingerprinting of culturable soil bacterial communities complements culture-independent analyses[J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2007, 39(7):1570-1579.
- [51] Michael W Friedrich. Stable-isotope probing of DNA: insights into the function of uncultivated microorganisms from isotopically labeled metagenomes[J]. *Current Opinion in Biotechnology*, 2006, 17:59-66.
- [52] Helen W. Kreuzer-Martin. Stable isotope probing: linking functional activity to specific members of microbial communities[J]. *Soil Sci*, 2007, 71:611-619.
- [53] Hong-Wei Zhou, Dong-Fang Li, Nora Fung-Yee Tam, et al. BIPES, a cost-effective high-throughput method for assessing microbial diversity[J]. *International Society for Microbial Ecology*, 2010:1-9.
- [54] J. Mounier, G. Le Blay, V. Vasseur, et al. Application of denaturing high-performance liquid chromatography (DHPLC) for yeasts identification in red smear cheese surfaces[J]. *The Society for Applied Microbiology, Letters in Applied Microbiology*, 2010, 51:18-23.