

汾酒大曲发酵过程微生物变化的初步分析

雷振河

(山西杏花村汾酒集团有限责任公司, 山西 杏花村 032205)

摘要: 基于传统微生物培养方法对汾酒大曲微生物在制曲过程的消长做了初步的统计分析, 并利用现代分子生态学的实验方法进行了跟踪尝试。试验表明, 酵母菌的数量整体呈先上升后下降趋势; 霉菌的数量整体呈先上升后下降趋势; 细菌在大曲发酵过程中的数量变化呈先上升后下降, 再略有上升, 然后逐渐下降的趋势。

关键词: 微生物; 汾酒; 大曲; 取样点; 消长

中图分类号: Q93-3; TS262.3; TS261.1

文献标识码: A

文章编号: 1001-9286(2011)06-0065-04

Preliminary Analysis of the Change of Microbes in the Fermentation Process of Fenjiu Daqu

LEI Zhenhe

(Fenjiu Group Co.Ltd., Xinghuachun, Shanxi 032205, China)

Abstract: The change of microbes in the fermentation process of Fenjiu Daqu was analyzed based on traditional microbe culture methods and such change was simultaneously traced by modern molecular ecology experiments. The results showed that mirozyme quantity and mildew quantity increased firstly and then dropped, and bacteria quantity increased firstly, then dropped, then increased slightly, and then dropped gradually. (Tran. by YUE Yang)

Key words: microbes; Fenjiu; Daqu; sampling point; growth and decline

大曲在白酒酿造过程中起着糖化发酵剂的作用, 同时, 也将自身特有的曲香直接或者衍生经过发酵蒸馏后带入到白酒中。大曲发酵主要是环境微生物在大曲中富集、生长并产生酶及代谢产物的过程。因此, 搞清楚大曲发酵过程微生物变化情况对控制大曲质量尤为重要。

研究大曲微生物最常用的方法是传统的平板分离法, 稀释涂布后计数。PCR-DGGE(聚合酶链式反应-变性剂梯度凝胶电泳) 技术可以不通过培养分离就可再现微生物群落结构, 避免传统分离造成的分析误差, 是新近发展起来的对特定环境中微生物群落演绎规律进行分析的技术。

本文分别采用传统平板分离法和 PCR-DGGE 技术对汾型大曲发酵过程中微生物变化情况进行了跟踪分析。

1 材料与方法

1.1 培养分离法检测发酵过程主要微生物变化情况

1.1.1 试验材料

细菌计数培养基: 肉汁培养基, MRS 培养基, 醋酸菌培养基, 牛肉膏蛋白胨培养基。

基金项目: 中国白酒“169”项目子课题。

收稿日期: 2011-04-20

作者简介: 雷振河, 男, 大学本科, 高级工程师, 国家注册高级品酒师, 高级酿酒师, 汾酒集团公司技术中心主任, 山西省政协委员。

酵母及霉菌计数培养基: DRBC 培养基, PCA 培养基, 麦芽汁培养基, PDA 培养基, 察氏培养基。

主要仪器设备:

AEL-160 电子分析天平, SHIMADZU Japan; 洁净工作台, 苏州净化设备有限公司 SW-CJ-2FD; LRH-250 生化培养箱, 上海一恒科学仪器有限公司。

1.1.2 试验方法

1.1.2.1 菌落分离

取 5 g 样品, 放入含有 45 mL 无菌水和玻璃珠的 100 mL 三角瓶中, 置于摇床上 180 r/min, 28 °C 振摇 30 min。用移液管吸取 1 mL 到装有 9 mL 无菌水的试管中, 振荡摇匀后, 再从中吸取 1 mL 到另一支含有 9 mL 无菌水的试管中。如此进行梯度稀释, 依次稀释到原浓度的 10^{-1} 、 10^{-2} 、 10^{-3} 、 10^{-4} 、 10^{-5} 、 10^{-6} 、 10^{-7} 、 10^{-8} 倍, 每个浓度梯度涂布 3 个平板。

1.1.2.2 微生物培养及观察

细菌: 35~37 °C, 培养 2~3 d, 观察计数;

酵母: 25~28 °C, 培养 2~3 d, 观察计数;

霉菌: 30 °C, 培养 5~7 d, 观察计数。

1.1.2.3 计数方法

一般选择 CFU(Colony-Forming Units), 菌落形成单位)在 20~300 之间的平板进行计数。在这个范围之外则不能正确地指示样品中微生物的真实数量。具体计数原则如下:

①为了避免虚假精确度的产生, 当进行活菌计数时, 只保留前两位有效数字。按照四舍五入原则对其进行取舍。

②当所有稀释梯度的 CFU 在 20~300 之间时。选择所有的平板进行计数。记录稀释倍数和相应的菌落总数。按下式计算:

$$\text{Formula: } N = \Sigma C / [(1 \times n_1) + (0.1 \times n_2)] \times (d)$$

其中: N——样品中的菌种数量;

ΣC ——所有平板上的菌落数之和;

n_1 ——第一个稀释倍数所数的平板数;

n_2 ——第二个稀释倍数所数的平板数;

d——所计数平板的第一个稀释倍数。

当某一稀释梯度的 CFU 既有在 20~300 个 /cm² 之中, 也有在 20~300 之外时, 选取 CFU 在 20~300 之间的平板进行计数。

③当所有平板的 CFU 都低于 20 个时, 记录稀释倍数最小平板的菌落数。

④当所有稀释倍数平板的 CFU 都大于 300 个 /cm² (但小于 100 个 /cm²) 时, 以 CFU 最接近于 300 个的平板作为计数标准, 其 CFU 值乘以其相应的稀释倍数即为样品含菌数的估计值。其他的标记为 TNTC(多不可计)。

⑤如果出现涂布问题或试验事故, 标记为 SPR (Spreader 缩写), 或 LA(Laboratory Accident 缩写)。

⑥如果所有平板的菌落浓度都大于 100 CFU/cm²。则以最高稀释倍数为准, 每平方厘米内含有的菌落数乘以平板的面积。

1.2 PCR-DGGE 法检测发酵过程微生物的变化

1.2.1 试验材料

①药品: 1×PBS 缓冲液(137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 4.3 mM Na₂HPO₄·7H₂O, 1.4 mM KH₂PO₄), 去离子水, TE 缓冲液(10 mM Tris-Cl, 1 mM EDTA, pH8.0), 无水乙醇, 琼脂糖, EB(溴化乙锭)溶液, 琼脂, 蛋白胨, 氯化钙, 聚丙烯酰胺, 氯化钠, 苯酚, 氯仿, 异戊醇, 氯化镁, CTAB, Bacto trytone, Bacto yeast extract, MgSO₄·7H₂O, 碳酸钙, 蒸馏水, 稀硫酸, 磷酸, 无水 Na₂SO₄; DNA Marker DL 1500, DNAMarker DL15000, Taq 酶, 蛋白酶 K, PCR 产物回收纯化试剂盒。

②主要仪器: 梯度 PCR 仪, 琼脂糖凝胶电泳仪, 凝胶成像仪, 漩涡分散器, 低速离心机, 高速冷冻离心机, 离心管(10 mL、1.5 mL 若干), 冰箱(4 °C、-20 °C), 电子天平,

纱布, 微量取样器(1000 μL、100 μL、10 μL), 培养皿, 烧杯, 紫外分光光度仪, 摇床培养箱, 电热恒温培养箱, 恒温水浴锅。

③PCR 引物: 细菌采用对大多数细菌和古细菌的 16SrDNA 基因 V3 区具有特异性的引物对: PRBA338F 与 PRUN518R:

上游引物为 GC-338f: 5'-CGC CCG CCG CGC GCG GCG GGC GGG GCG GGG GCA CGG GGG GAC TCC TAC GGG AGG CAG CAG-3'

下游引物为 518R: 5'-ATT ACC GCG GCT GCT GG-3'

酵母选择巢式 PCR, 采用 26S rDNA 的 D1/D2 区的 2 对通用引物:

第一次 PCR:

上游引物为 NL-1: 5'-GCA TAT CAA TAA GCG GAG GAA AAG-3'

下游引物为 NL-4: 5'-GGT CCG TGT TTC AAG ACG G-3'

第二次 PCR:

上游引物为 GC-NL1: 5'-GCG GGC CGC GCG ACC GCC GGG ACG CGC GAG CCG GCG GCG GGG CAT ATC AAT AAG CGG AGG AAA AG-3',

下游引物为 LS2: 5'-ATT CCC AAA CAA CTC GAC TC-3'。

划线部分为 GC 夹板。

上述引物均由上海生工合成提供。

1.2.2 试验方法

1.2.2.1 DNA 提取

在提取 DNA 之前, 对样品进行洗涤, 以减少胞外 DNA 和可溶性有机物尤其是腐殖酸类物质的污染。在 5 g 样品中加入 3 mL 120 mmol/L 的 PBS 缓冲液(pH 8.0), 振荡器上 180 r/min 匀速振荡 30 min, 然后以 5500 r/min 速度离心 7 min; 沉淀再次洗涤后用于后续实验。

采用溶壁酶破壁法提取细菌基因组:

①在样品中加入 DNA 提取液(0.1 mol/L Tris-HCl, 0.1 mol/L EDTA, 0.1 mol/L Na₃PO₄, 1.5 mol/L NaCl, 1% CTAB, pH 8.0) 1 mL、10 μL 的蛋白酶 K (10 mg/mL)、10 μL 溶菌酶(10 mg/mL)、10 μL 溶壁酶(10 mg/mL), 37 °C 200 r/min 振荡 1.5 h;

②加入 200 μL 20 % SDS, 置于 65 °C 水浴 1 h 以上, 5500 r/min 离心 5 min;

③上清液转入新的离心管, 沉淀中再加入 0.75 mL 的提取液和 75 μL 20 % SDS, 以 2800 r/min 涡旋振荡 10 s, 65 °C 水浴 20 min, 室温, 5500 r/min 离心 5 min;

④上清液转入新的离心管, 合并所有的上清液;

⑤加入等体积的 24:1(v/v)氯仿-异戊醇,5500 r/min 离心 5 min,回收水相;

⑥在水相中加入 0.6 倍体积预冷的异丙醇,-20℃放置 1.5 h 沉淀 DNA,15000 r/min 离心 10 min,去上清液;

⑦沉淀用预冷的 70%vol 乙醇重复洗涤和干燥;

⑧加入 50 μ L 的 TE 缓冲液溶解 DNA。

1.2.2.2 PCR 扩增

细菌 16SrDNA 扩增采用降落 PCR

反应体系:10 $\times$ PCR buffer 5 μ L,dNTP (2.5 mM) 4 μ L,10 μ M primerF 1 μ L,10 μ M primerR 1 μ L,Taq polymerase(5 units) 0.5 μ L,template(30 ng) 2 μ L,加水至 50 μ L。

反应程序为 94℃预变性 4 min,先 20 个循环(94℃变性 30 s,退火温度从 65~55℃,每个循环降低 0.5℃,退火 30 s,72℃延伸 30 s),再于恒定退火温度下进行 10 个循环(94℃变性 30 s,55℃退火 30 s,72℃延伸 30 s),最终 72℃延伸 10 min。扩增在梯度 PCR 仪上进行,PCR 产物用 1.0%琼脂糖凝胶电泳分析检测,DNA Marker DL1500 作为对照。

1.2.2.3 变性梯度凝胶电泳(DGGE)

PCR 产物的 DGGE 分析在 Bio-Rad Dcode System (美国)上进行,取 PCR 产物 40 μ L,加入 10 μ L 6 $\times$ Loading Buffer 混匀上样。聚丙烯酰胺凝胶浓度为 8%(丙烯酰胺:甲叉双丙烯酰胺 37.5:1)。变性梯度从 30%到 70%(100%变性剂含有 7 mol/L 尿素和 40%甲酰胺),在 1 $\times$ TAE 缓冲液中,先 200 V 预电泳 5~10 min,然后在 60 V 的固定电压下电泳 16~18 h。EB 染色后用凝胶成像系统进行照相。图像分析用 Quantity one(Bio-rad)分析软件进行分析。

1.3 取样点的确定

根据生产经验、结合大曲生产工艺的生产特点,确定大曲生产过程中可能对大曲质量产生影响的重要阶段的关键点作为取样点。

结合实际生产经验和大曲生产的工艺特点,选取大曲发酵过程中的 8 个关键点作为优化点,取样方法为:

优化取样点 1:取大麦、豌豆混合粉碎后加水拌和前的原料,从暂贮仓分别取 5 个不同位置,混匀,备用;

优化取样点 2:取卧曲前压制好的曲块,随机选取 3 块,将大曲按对角平分 2 块,取其中 1 块粉碎混匀,备用;

优化取样点 3:晾霉结束时,在曲房不同位置随机挑取 3 块有代表性大曲,将大曲按对角平分 2 块,取其中 1 块粉碎混匀,备用;

优化取样点 4:取前火(潮火)结束时大曲,在曲房不同位置随机挑取 3 块有代表性大曲,将大曲按对角平分 2 块,取其中 1 块粉碎混匀,备用;

优化取样点 5:取大火结束时大曲,在曲房不同位置随机挑取 3 块有代表性大曲,将大曲按对角分成 2 块,取其中 1 块粉碎混匀,备用;

优化取样点 6:取后火结束时大曲,在曲房不同位置随机挑取 3 块有代表性大曲,将大曲按对角平分 2 块,取其中 1 块粉碎混匀,备用;

优化取样点 7:出房验收时,随机选取经品评合格的大曲 3 块,将大曲按对角平分 2 块,取其中 1 块粉碎混匀,备用;

优化取样点 8:随机选取不同贮存期的大曲 3 块,将大曲按对角平分 2 块,取其中 1 块粉碎混匀,备用。

样品粉碎及保存方法:要求过 0.3 mm 筛孔,封装于密封袋中,置于-20℃保存 1~3 个月或-4℃保存 7 d,备用。

2 结果与分析

2.1 大曲发酵过程主要微生物的消长规律

选取大曲发酵过程中的 8 个关键点,采用稀释涂布、平板计数的方法对其中细菌、酵母、霉菌的微生物数量进行测定,并绘制其数量随发酵进行的变化曲线(图 1)。

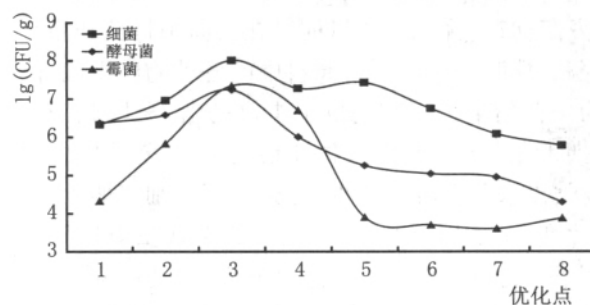


图 1 大曲发酵过程主要微生物类群的动态变化趋势

由试验结果可以看出,各中微生物的数量变化整体呈先上升后下降的趋势。在优化点 2 和优化点 3 之间为各种菌种的繁殖时期,数量达到最大值;此后各种微生物的数量逐渐减少。

酵母菌的数量整体呈先上升后下降趋势。在优化点 1 时,酵母菌已有相当的数量,为 10^6 CFU/g;优化点 3 数量达到最大值 10^7 CFU/g;然后数量逐渐呈下抛物线下降,到出房时(优化点 7),数量为 10^5 CFU/g;在贮存时期数量又有所下降(图 1)。

在优化点 3 以前,由于霉菌和糖化酶的作用,使淀粉水解,一部分水分被释放出来,同时糖分增加,使酵母菌获得了生长的条件,因此其大量繁殖;优化点 3 以后进入前火、大火、后火阶段,由于大曲品温上升,水分由蒸发而减少,大大抑制了酵母菌的生长繁殖,因此致使大曲中酵母的生长率小于死亡率,从而使酵母数量逐渐下降。

霉菌的数量整体呈先上升后下降趋势。在优化点 1

时,霉菌数量较少,为 10^4 CFU/g;发酵开始时,霉菌的数量增速最快,到优化点3数量达到最大值 10^7 CFU/g;然后数量逐渐呈上抛物线下降,到优化点5时,数量基本趋于稳定,为 10^4 CFU/g;在贮存时期数量又有所上升。

在优化点3以前,由于大曲中水分含量较少,而霉菌生长对水分的要求最低,因此,霉菌的生长速率要明显大于酵母和细菌;优化点3以后进入前火、大火、后火阶段,由于大曲的品温上升,霉菌生长受到抑制,所以生长速率小于死亡速率,数量呈下降趋势,但霉菌对水分要求比酵母低,因此下降速率要小于酵母菌;进入大火期由于温度很高,霉菌死亡率上升,因此,在优化点5时,霉菌数量的下降速率又明显高于酵母;之后数量稳定在较低的水平,可能是由于水分的减少使霉菌的死亡率下降,趋于稳定。

细菌在大曲发酵过程中的数量变化呈先上升后下降,再略有上升,然后逐渐下降的趋势。原料中(优化点1)就有相当量的细菌存在,在 10^6 CFU/g,入房后(优化点2和优化点3),数量急剧上升,晾霉结束后,达到 10^8 CFU/g;在优化点4,数量略有下降;进入优化点5数量又有所上升;然后数量逐渐下降,出房时(优化点7),为 10^6 CFU/g;贮存过程(优化点8),略有下降。

发酵初期(优化点3以前),在大曲中霉菌和糖化酶、蛋白酶、酯酶的作用下,原料中的各种物质得以释放分解,为细菌的生长繁殖提供了丰富的营养,因此,其在发酵初期大量的繁殖;发酵中期,由于酵母菌的生长,氧气的消耗,以水分含量的减少,导致大部分细菌的生长环境受到改变,不能满足细菌的生长,细菌数量有所下降;同时,由于优化点3以后温度急剧升高,致使一些不耐高温细菌死亡率升高,也使其总体数量有所下降;优化点4以后进入大火期,水分进一步蒸发,导致细菌死亡率大于生长率,从而使数量减少,但其中有相当一部分以芽孢休眠体存在,因此,数量仍维持相当水平。

总之,从微生物类群的整体数量变化来看,水分和温度是控制微生物数量而影响微生物代谢,进而影响大曲质量的最重要的因素,而水分又是通过温度来进行控制的。因此,温度是关系大曲质量的重要的可控的优化因素。

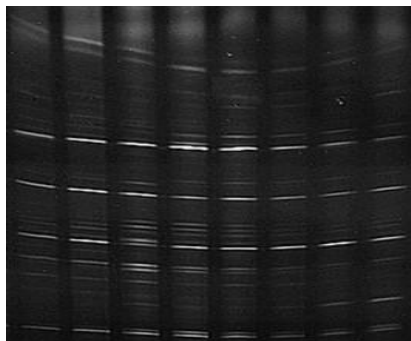
原料是大曲菌种的最重要的来源,因此,在相同的操

作条件下,原料的选择对大曲质量具有重要的作用,其也为优化大曲工艺的一个重要关键点。

温度、水分是大曲发酵过程中重要的控制因素,而原料的粉碎度对温度和水分的变化具有重要的影响,因此,大曲的粉碎度也是优化大曲工艺的重要关键点。

2.2 16S rDNA PCR-DGGE 方法检测发酵过程主要微生物类群变化

为了进一步从微生物的角度研究各优化点对大曲质量的影响,基于非培养的 16S rDNA PCR-DGGE 技术对大曲不同发酵阶段的菌种变化情况进行了跟踪检测,检测结果见图2。



注:条带由左至右分别为优化点1,优化点2,……优化点8。

图2 大曲发酵过程细菌动态变化趋势的
16S rRNA PCR-DGGE 检测结果

由图2可以看出,在发酵过程一共检测到30种以上原核微生物,其中数量较多的有10~13种,且各种微生物类群在发酵过程有较为明显的变化,这也说明了大曲的发酵过程是一个动态的过程,在相应的阶段由不同的菌种体系完成相应物质的生成,从不同的方面影响大曲的质量。

参考文献:

- [1] 洪光住.中国食品科技史稿[M].北京:中国商业出版社,1984.
- [2] 李大和.建国五十年来白酒生产技术的伟大成就(六)[J].酿酒,1999(6):19-31.
- [3] 张国强.论白酒的个性化[J].酿酒科技,2005(2):92-95.
- [4] 熊子书.中国三大香型白酒的研究(三)清香·杏花村篇[J].酿酒科技,2005(7):17-21.
- [5] 韩莎,雷振河,李奇.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.

洋河、双沟获“中华老字号”招牌

本刊讯 据《华夏酒报·中国酒业新闻网》报道,江苏省商务厅5月26日为第二批共61家企业授予“中华老字号”招牌,至此,该省共有96家企业成为“中华老字号”,其中食品、餐饮行业老店最多。洋河、双沟、高沟、汤沟、梅兰春等酒类品牌榜上有名。目前商务部共认定1129家“中华老字号”,江苏96家企业入选,占全国的8.5%,是“老字号”比较集中的省份。其中,江苏“100岁”以上的企业有53家,时间最长的有350年历史,时间最短的也有55年历史。(小小)

来源:华夏酒报·中国酒业新闻网 2011-5-30