

# 应用 PCR-DGGE 技术分析酱香型白酒酒曲细菌多样性

谭映月<sup>1,2</sup> 胡萍<sup>1,2</sup> 谢和

(1.贵州大学生命科学学院,贵州 贵阳 550025;2.贵州省农畜产品贮藏加工重点实验室,贵州 贵阳 550025)

**摘要:** 利用 PCR-DGGE 技术研究酱香型白酒制曲过程中的细菌菌群结构及其消长规律,鉴定出不同样品的优势菌群。结果表明,酱香型大曲间的细菌组成存在明显差异,母曲与出仓曲的相似性系数仅为 0.29。随着曲药的发酵,细菌多样性下降,优势菌群变化明显。其中,芽孢杆菌属(*Bacillus*)、明串珠菌属(*Leuconostoc*)、片球菌属(*Pediococcus*)、魏斯氏菌属(*Weissella*)、棒状杆菌属(*Corynebacterium*)、高温放线菌属(*Thermoactinomyces*)和乳酸杆菌属(*Lactobacillus*)是母曲和翻仓曲的优势菌群,而出仓曲的主要类群为芽孢杆菌属(*Bacillus*)和乳酸杆菌属(*Lactobacillus*)。另外,还发现了在白酒曲药中不曾报道的种群和不能培养的细菌:Uncultured *Propionibacteriaceae* bacterium、Uncultured *Weissella* sp.、Uncultured *cyanobacterium*。该技术克服了传统分离培养的缺点。

**关键词:** PCR-DGGE; 酱香型白酒酒曲; 细菌多样性

中图分类号:TS261.1;TQ925.7;TS262.33;TS261.4;Q93-3 文献标识码:A 文章编号:1001-9286(2012)10-0107-05

## Application of PCR-DGGE to Analyze Bacterial Diversity in Maotai-flavor Daqu

TAN Yingyue<sup>1,2</sup>, HU Ping<sup>1,2</sup> and XIE He

(1.College of Life Sciences, Guizhou University, Guiyang, Guizhou 550025; 2. Guizhou Key Lab of Agricultural & Animal Products Storage and Processing, Guiyang, Guizhou 550025, China)

**Abstract:** The structure and the change rules of bacterial communities in Maotai-flavor Daqu during the fermentation were analyzed by PCR-DGGE. DNA sequencing was then proceeded to identify the dominant bacteria groups in different Daqu samples. The results showed that there was a significant difference in the composition of bacterial community in different Daqu samples and the similarity index was only 0.33 between Q1 and Q3. The bacterial diversity decreased and an obvious change occurred in dominant bacterial community as the fermentation proceeded. *Bacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Weissella*, *Corynebacterium*, *Thermoactinomyces* and *Lactobacillus* were the predominant microflora in Q1 and Q2, but the dominant groups in Q3 merely included *Bacillus* and *Lactobacillus*. Besides, some uncultured bacteria and some bacterial communities never reported before such as uncultured *Propionibacteriaceae* bacterium, uncultured *Weissella* sp. and uncultured *cyanobacterium* were found in our study. Therefore, PCR-DGGE could effectively overcome the shortcomings of traditional culture and isolation techniques.

**Key words:** PCR-DGGE; Maotai-flavor Daqu; bacterial diversity

由于原料、酿造工艺和生态环境等各方面因素的不同使得我国白酒呈现五大类香型:酱香型、浓香型、清香型、米香型和其他香型。其中,以国酒茅台为主要代表的酱香型白酒由于其酒体醇厚、回味悠长等特点在我国白酒中占有重要的地位。在白酒酿造的过程中,酒曲作为酿造的主要动力,直接影响着酒体的最终品质。按照制曲温度可把酒曲分为高温、中高温和中温大曲,其中酱香型白酒以高温大曲作为原料,制曲温度可高达 60~62℃<sup>[1]</sup>,从而孕育了大批宝贵而丰富的耐高温微生物资源。这些微生物通过自身的生长繁衍、交替演绎,形成复杂的代谢网络和丰富的酶系,是生产优质酱香酒是直接原料和重

要“工程师”,也成为酱香型白酒无法复制的核心部分。因此,研究酱香型白酒大曲内微生物的多样性及其消长规律,是弄清微生物代谢与酒体呈香呈味机制的首要任务。

目前,对酒曲微生物多样性的研究多以浓香型白酒为研究对象<sup>[2-3]</sup>,而对酱香型白酒的研究较少。从技术上看,酿酒微生物的研究多利用传统分离培养技术进行分析,现代分子生物技术虽然在近年来有初步应用,但仍显局限。因此,本研究采用镶嵌式 PCR 和变性梯度凝胶电泳(DGGE)非培养技术研究酱香型白酒制曲过程中微生物菌落组成及其动态变化,克服了传统分离培养技术耗时耗力和仅能培养环境中 1%~10%的微生物等缺点,

基金项目:贵州省茅台基金项目 黔科合茅科联字[2009]7003。

收稿日期:2012-06-19

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

通讯作者:胡萍(1970-),女,教授、硕士生导师,博士,研究方向为食品营养与食品微生物,Email:ls.phu@gzu.edu.cn。

优先数字出版时间:2012-08-02;地址:<http://www.cnki.net/kcms/detail/52.1051.TS.20120802.1644.007.html>。

更加直观、准确地反映了酱香型大曲的微生物多样性状况。从而对充分认识和发掘酿酒微生物资源、调控白酒制曲工艺、改善酒体品质和提高白酒商品价值有重要指导意义。

## 1 材料与amp;方法

### 1.1 材料、试剂及仪器

样品采自贵州省某酱香型白酒酒厂,采样时间为2010年4月,共3个样品,见表1。

表1 样品信息表

编号	样品	样品来源
Q1	母曲	制曲车间
Q2	第一次翻仓曲	制曲车间
Q3	出仓成品曲	制曲车间

仪器和试剂:S1000™ Thermal Cycler PCR仪,美国Bio-rad公司;Dcode™ Universal Mutation Detection System DGGE仪,美国Bio-rad公司;Gel DocXR凝胶成像仪,美国Bio-rad公司;Go Taq Green Master Mix,美国Promega公司;PCR扩增引物由上海生工合成。

### 1.2 实验方法

#### 1.2.1 样品总DNA的提取

参考文献<sup>[4]</sup>对大曲进行总DNA的提取:取10g样品加入30mL PBS缓冲液(137mM NaCl,2.7mM KCl,4.3mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O,1.4mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>)涡流振荡5min,超声处理5min(4℃),后用2层纱布过滤。滤液收集在30mL离心管中,8000×g离心10min(4℃)。收集沉淀,重新加入0.5mL PBS缓冲液并转移到2mL离心管中。加入0.5mL的CTAB裂解液,0.5g玻璃珠和0.5mL的酚:氯仿:异戊醇(25:24:1)混合液,用细胞破碎仪进行机械破碎,然后16000×g离心5min(4℃)。收集上清液,加入等体积的氯仿:异戊醇(24:1)溶液,混匀,16000×g离心5min(4℃)。收集上清液,加入2体积30%的聚乙二醇4℃沉淀2h,之后18000×g离心10min(4℃)。弃上清液,用冰乙醇沉淀DNA,经真空干燥后,加入50μL TE缓冲液溶解。加入RNA酶处理30min(37℃),分别用酚:氯仿:异戊醇(25:24:1)和氯仿:异戊醇(24:1)进行抽提。用冰乙醇沉淀,真空干燥后溶于50μL TE缓冲液。

#### 1.2.2 嵌套式PCR扩增

采用嵌套式PCR进行扩增,引物见表2。

第1轮PCR扩增:用27F和1492R通用引物<sup>[5]</sup>进行16S rDNA全长扩增。反应体系(25μL):1μL模板DNA,引物(10μM)各0.25μL,Go Taq Green Master Mix(Promega,美国)12.5μL,去离子水11μL。反应程序:94℃预变性5min;94℃变性1min,退火温度从

表2 用于16S rDNA扩增的引物

引物	引物序列(5'-3')	参考文献
27F	AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG	[5]
1492R	GGT TAC CTT GTT ACG ACT T	[5]
GC <sup>a</sup> -338F	GC夹-ACT CCT ACG GGA GGC AGC AG	[6]
518R	ATT ACC GCG GCT GCT GG	[6]

注:GC<sup>a</sup>:在引物的5'端加入了一个富含GC序列的GC夹CGC CCG CCG CGC GCG GCG GGC GGG GCG GGG GCA CGG GGG G。

65℃降至55℃(前20个循环每个循环降低0.5℃)45s,72℃保持2min,共30个循环;72℃延伸5min。

第2轮PCR扩增:用GC-338F和518R引物<sup>[6]</sup>扩增细菌16S rDNA V3区。反应体系(25μL):以1μL稀释100倍的扩增产物作模板DNA,引物(10μM)各0.25μL,Go Taq Green Master Mix(Promega,美国)12.5μL,去离子水11μL。反应程序:94℃预变性5min;94℃变性1min,退火温度从65℃降至55℃(前20个循环每个循环降低0.5℃)45s,72℃保持1min,共30个循环;72℃延伸5min。

第3轮PCR扩增:用GC-338F和518R引物对第2轮PCR产物进行Reconditioning PCR减少PCR过程中产生的异构二聚体<sup>[7]</sup>。反应体系(25μL):2.5μL第2轮PCR产物作为模板,引物(10μM)各0.25μL,Go Taq Green Master Mix(Promega,美国)12.5μL,去离子水8.5μL。反应程序:94℃预变性5min;94℃变性1min,55℃退火45s,72℃1min,共5个循环;72℃延伸5min。PCR产物用1%琼脂糖凝胶电泳检测。

#### 1.2.3 变性梯度凝胶电泳(DGGE)分析

采用Bio-rad Dcode™ Universal Mutation Detection System对样品16S rDNA的V3区扩增产物进行电泳。电泳条件:8%聚丙烯酰胺凝胶,变性剂梯度45%~65%(100%变性剂含有7mol/L尿素和40%甲酰胺),0.5×TAE缓冲液,200V预电泳10min,随后75V电泳14h。银染后放入凝胶成像仪(Bio-rad Gel DocXR)内照相。DGGE条带用Quantity One(Bio-rad)软件进行聚类分析和Shannon-Wiener多样性指数分析。

#### 1.2.4 条带回收及DNA测序

在切胶台上无菌切下需要回收的条带,分别放入已编号的离心管中,加入20μL无菌去离子水,4℃放置过夜。用酒精沉淀法回收DNA<sup>[8]</sup>,以回收DNA作为PCR模板扩增V3区,条件同上,然后重新进行DGGE,比对回收条带是否与原始条带位置一致,若一致,再次切胶回收,用引物338F(无GC夹)和518R进行16S rDNA V3可变区的扩增,经Takara公司的PCR产物纯化试剂盒纯化后,送华大基因公司测序分析。登录NCBI,与GeneBank数据库中的已知序列进行比对。

## 2 结果与分析

### 2.1 酒曲细菌 DNA 的 DGGE 分析

按实验方法对酒曲细菌的 DNA 进行 DGGE 分析, 结果见图 1~图 3。

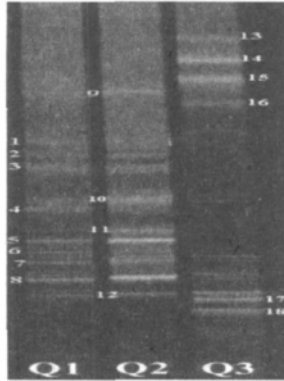


图 1 酒曲细菌 16S rDNA V3 可变区的 DGGE 图谱

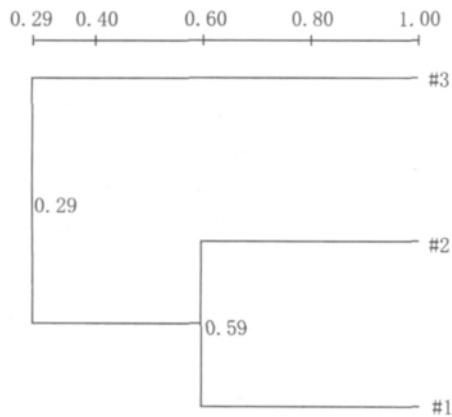


图 2 DGGE 图谱聚类分析

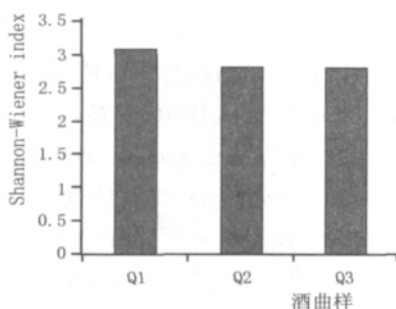


图 3 酒曲细菌多样性指数分析

从图 1 可知, 共检测到 26 条不同条带, 样品 Q1、Q2 有 9 个共同条带而它们与 Q3 仅有 5 条共同条带, 说明酱香型白酒酒曲细菌种群结构较为复杂, 且不同曲药间的细菌组成存在明显差异。通过图谱聚类分析样品间相似性(图 2)发现, 母曲与翻仓曲结构比较相似, 相似性指数为 0.59, 而与出仓曲结构差异较大, 相似性指数仅为 0.29。结合多样性指数分析来看(图 3), 制曲过程中, 母曲

的多样性最高, 经过第一次翻仓之后细菌多样性降低, 但条带 5、8、9、10、12 的亮度增加, 说明这几条条带代表的细菌是翻仓酒曲的优势菌群且数量增多, 这可能是由于第一次翻仓属于制曲初期, 随着温度的升高、水分的蒸发, 抑制了不耐热微生物的生长, 而耐热细菌生长迅速, 成为优势菌。直至酒曲出仓, 细菌的多样性继续下降, 此时样品 Q3 的细菌组成与 Q1、Q2 差异最为明显, 条带 12、13、14、15、16、17、18 代表的微生物成为优势菌, 这是因为出仓曲的温度达到最高值, 水分含量极低, 再加上经过 2 次翻仓发酵, 水分、氧气和营养基质的减少使得原本能在母曲和翻仓曲中生存的微生物大量死亡, 筛选出了另一批能够在高温低湿的恶劣环境下存活的微生物, 这些微生物也是制酒过程中形成酱香型独特风味的重要成员。

### 2.2 主要条带的测序分析

对 DGGE 图谱上主要条带(1~18)进行切胶回收, 重新 PCR 后测序, 用 NCBI 的 BLAST 软件与 GenBank 中的已知序列进行比对, 比对结果见表 3。

表 3 DGGE 图谱上主要条带的测序结果

条带	亲缘性最近的菌株	序列号	相似性 (%)
1	Uncultured <i>Propionibacteriaceae</i> bacterium	JN232329.1	99
2	<i>Bacillus racemilacticus</i>	D16279.1	97
3	<i>Leuconostoc citreum</i>	AB572028.1	100
4	<i>Staphylococcus pettenkoferi</i>	AF322002.2	99
5	<i>Pediococcus acidilactici</i>	JN014069.1	99
6	Uncultured <i>Weissella</i> sp.	JF340065.1	100
7	<i>Corynebacterium variabile</i>	FJ155344.1	98
8	<i>Thermoactinomyces sanguinis</i>	AJ251778.1	100
9	<i>Bacillus licheniformis</i>	JN409995.1	100
10	<i>Sphingomonas yabuuchiae</i>	HQ739093.1	99
11	Uncultured <i>cyanobacterium</i>	JN038984.1	100
12	<i>Lactobacillus sakei</i>	JF781305.1	100
13	<i>Oceanobacillus caeni</i>	FN397525.1	100
14	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	JN558839.1	100
15	<i>Bacillus sonorensis</i>	HQ336631.1	100
16	<i>Bacillus subtilis</i>	JF322991.1	100
17	<i>Lactobacillus curvatus</i>	JF756310.1	98
18	<i>Lactobacillus manihotivorans</i>	HQ009788.1	99

回收条带 DNA 序列比对的同源性均在 97% 以上, 结合 DGGE 图谱可知, 在制曲和制酒过程中细菌存在明显的动态变化。作为制曲原料的母曲细菌种类最多, 从属于芽孢杆菌属 (*Bacillus*)、丙酸杆菌属 (*Propionibacterium*)、明串珠菌属 (*Leuconostoc*)、葡萄球菌属 (*Staphylococcus*)、片球菌属 (*Pediococcus*)、魏斯氏菌属 (*Weissella*)、棒状杆菌属 (*Corynebacterium*)、高温放线菌属 (*Thermoactinomyces*) 和乳酸杆菌属 (*Lactobacillus*)。在酱香型

白酒酿造过程中,有机酸的产生是形成浓郁酱香风味不可或缺的一步。母曲中除了乳酸片球菌(*Pediococcus acidilactici*)和乳酸杆菌(*Lactobacillus*)能产生丰富的乳酸外,通常作为奶酪发酵剂的变异棒杆菌(*Corynebacterium variabile*)也能发酵蔗糖、果糖、甘露糖和阿拉伯糖产酸,而同时存在于3个样品中的条带2所代表的消旋乳酸杆菌(*Bacillus racemilacticus*)是芽孢杆菌属中能产生乳酸的菌种,能生成DL-乳酸等有机酸。在有机酸丰富的发酵环境中,条带3代表的柠檬明串珠菌(*Leuconostoc citreum*)能通过异型乳酸发酵,代谢柠檬酸形成风味成分双乙酰,这些微生物的代谢产物都为白酒风味的形成提供了丰富的前体物质。另外母曲中还发现了不能培养的魏斯氏菌属(*Weissella*)和丙酸杆菌科(*Propionibacteriaceae*)的细菌,其中*Weissella sp.*在浓香型和酱香型大曲<sup>[9]</sup>、浓香型和芝麻香型酒醅<sup>[10-11]</sup>以及烧酒<sup>[12]</sup>的发酵过程中都有检出,说明该菌属是白酒酿造过程中的重要成员。而*Propionibacteriaceae bacterium*是乳制品(尤其是干酪)的正常菌群,它们能够利用独特的转羧基酶合成丙酸,从而增强白酒的酱香风味。

随着曲块的发酵,不耐热的细菌逐渐死亡。到第一次翻仓时,菌群种类减少,地衣芽孢杆菌(*Bacillus licheniformis*)、*Sphingomonas yabuuchiae*、乳酸片球菌(*Pediococcus acidilactici*)、高温放线菌(*Thermoactinomyces sanguinis*)、清酒乳酸杆菌(*Lactobacillus sakei*)以及不能通过传统培养的蓝藻菌(*Uncultured cyanobacterium*)数量急剧增加,成为这一时期的优势菌群。其中,高温放线菌(*Thermoactinomyces sanguinis*)数量增加最为明显,高亦豹<sup>[9]</sup>等研究发现,高温放线菌仅存在酱香型酒曲中,而浓香型酒曲未检出,这可能是由于它能耐受高温的特点使其在酱香型高温制曲的过程中得以存活。同时还发现了酒曲研究中未见报道的鞘氨醇单胞菌属中的*Sphingomonas yabuuchiae*,由于*Sphingomonas yabuuchiae*能够在营养贫乏的极端环境中生长,生命力顽强,因此能在酱香型白酒制曲的高温 and 曲块极低的水分含量而生存下来,研究显示<sup>[13]</sup>,它能够降解复杂有机污染物(如多环芳烃),某些种属还能产生有价值的生物高分子(如 $\beta$ -胡萝卜素),具有提高人体免疫能力,预防和减缓癌症的作用,从而更加增进了酱香型白酒与人体健康之间的关系。

最后酒曲出仓,条带1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11消失或减弱,取而代之的是新出现的条带13、14、15、16、17、18。出仓曲的主要类群从属于芽孢杆菌属(*Bacillus*)和乳酸杆菌属(*Lactobacillus*)两大菌属,包括嗜盐芽孢杆菌(*Oceanobacillus caeni*)、解淀粉芽孢杆菌(*Bacillus amyloliquefaciens*)、索诺拉沙漠芽孢杆菌(*Bacillus*

*sonorensis*)、枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)、清酒乳酸杆菌(*Lactobacillus sakei*)、弯曲乳酸杆菌(*Lactobacillus curvatus*)和*Lactobacillus manihotivorans*,这是因为曲块出仓,微生物大量死亡,只有耐受高温和贫瘠环境的芽孢杆菌和乳杆菌能够存活下来,成为优势菌。其中清酒乳酸杆菌(*Lactobacillus sakei*)在工业上多用于肉制品发酵<sup>[14]</sup>,它通过产生乳酸等代谢产物保持鱼肉制品的新鲜度,它在制曲过程中数量逐渐增加,出仓曲的条带亮度最强。同时在酱香型出仓成品曲中检测到的*Lactobacillus manihotivorans*属于浓香型白酒酒醅发酵后期的优势菌<sup>[11]</sup>,它能够耐受窖池发酵的厌氧、酸度高、酒精度高环境而存活下来。另外有研究发现,芽孢杆菌<sup>[15]</sup>能够促进以甘氨酸、葡萄糖和氯化钠为原料的美拉德反应迅速发生,生产出乙醛、乙缩醛、乙酸、乙酸乙酯、丁二醇等风味物质,形成浓郁的酱香风味,所以芽孢杆菌属也是后续酱香型白酒制酒过程中的主力军。

### 3 讨论

采用PCR-DGGE分子生态学技术分析了酱香型大曲细菌菌落结构及其在制曲过程中的动态变化。通过DGGE图谱可以直观地观察到酱香型母曲、翻仓曲和出仓成品曲细菌菌群结构存在明显的差异。随着制曲过程的进行,细菌多样性逐渐下降,且各阶段的优势菌也不尽相同,这些变化都与酱香型白酒独特的高温制曲工艺中温湿度、营养基质和氧气等因素的变化有密切联系。通过主要优势条带回收测序,发现酱香型酒曲中主要存在10个菌属,其中芽孢杆菌属(*Bacillus*)和乳酸杆菌属(*Lactobacillus*)在不同酒曲样品中同时存在,也成为制曲后期的绝对优势菌,对形成浓郁的酱香风味有重要作用。另外,研究发现了未曾在白酒曲药中有所报道的丙酸杆菌属(*Propionibacterium*)、棒状杆菌属(*Corynebacterium*)和鞘氨醇单胞菌属中的*Sphingomonas yabuuchiae*等细菌,其中*Sphingomonas yabuuchiae*产生的活性生物高分子(如 $\beta$ -胡萝卜素),对预防和减缓癌症的发展有重要作用<sup>[13]</sup>,增进了酱香型白酒与人体健康之间的关系。与传统技术相比较,利用传统分离培养手段研究酱香型大曲<sup>[16]</sup>分离得到芽孢杆菌属(*Bacillus*)、醋杆菌属(*Acetobacter*)、乳酸杆菌属(*Lactobacillus*)和梭状芽孢杆菌属(*Clostridium*)等4类菌属,而用PCR-DGGE现代分子手段共检测到10种菌属,其中*Uncultured Propionibacteriaceae bacterium*、*Uncultured Weissella sp.*、*Uncultured cyanobacterium*属于非培养细菌,这就说明要全面准确地了解酱香型大曲微生物多样性除了传统分离培养,更需要先进的分子手段。在利用现代分子技术解析酱香型大曲细菌多样性

的基础上,进一步对真核微生物区系及其相互协同制约的代谢机制的分析和探讨将成为今后的研究重点方向,这对揭开微生物与白酒风味形成之间的神秘面纱有重要意义。

#### 参考文献:

- [1] 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.
- [2] 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.
- [3] 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(8):42-45.
- [4] Wenxue Zhang, Zongwei Qiao, Toru Shigematsu, et al. Analysis of the bacterial community in zaopei during the production of the Chinese luzhou-flavor liquor. [J]. The institute of Brewing and Distilling, 2005, 111(2): 215-222.
- [5] Karita S, Nakayama K, Goto M, et al. A novel cellulolytic, anaerobic, and thermophilic bacterium, moorella sp strain F21 [J]. Bioscience, Biotechnology and Biochemistry, 2003, 67(1): 183-185.
- [6] Ampe F, Ben Omar N, Moizan C, et al. Polyphasic study of the spatial distribution of microorganisms in mexican pozol, a fermented maize dough, demonstrates the need for cultivation-independent methods to investigate traditional fermentations [J]. Applied and Environmental Microbiology, 1999, 65: 5464-5473.
- [7] Thompson J.R., Marcelino L.A., Polz M.F. Heteroduplexes in mixed-template amplifications: formation, consequence and elimination by 'reconditioning PCR' [J]. Nucleic Acids Res, 2002, 30: 2083-2088.
- [8] 王小芬,王伟东,高丽娟,等.变性梯度凝胶电泳在环境微生物研究中的应用详解[J].中国农业大学学报,2006,11(5):1-7.
- [9] 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.
- [10] 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.
- [11] HaiYan Wang, XiaoJun Zhang, LiPing Zhao, et al. Analysis and comparison of the bacterial community in fermented grains during the fermentation for two different styles of Chinese liquor [J]. J Ind Microbiol Biotechnol, 2008, 35: 603-609.
- [12] Akihito Endo, Sanae Okada. Monitoring the lactic acid bacterial diversity during shochu fermentation by PCR-denaturing gradient gel electrophoresis [J]. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2005, 99(3): 216-221.
- [13] 胡杰,何晓红,李大平,等.鞘氨醇单胞菌研究进展[J].应用与环境生物学报,2007,13(3):431-437.
- [14] Anette McLeod, Monique Zagorec, Marie-Christine Champomier-Verges, et al. Primary metabolism in *Lactobacillus sakei* food isolates by proteomic analysis [J]. BMC Microbiology, 2010, 10: 120.
- [15] 刘晓光,谢和,屈直.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.
- [16] Chang-lu Wang, Dong-jian Shi, Guo-li Gong. Microorganisms in Daqu: a starter culture of Chinese Maotai-flavor liquor [J]. World J Microbiol Biotechnol, 2008, 24: 2183-2190.

## 湖北枝江酒业上榜 2012 中国民企 500 强

本刊讯 2012 年 9 月 4 日,笔者从湖北省枝江市经济和信息化局获悉,2012 年 8 月 30 日,全国工商联在京召开 2012 中国民营企业 500 强发布会,发布 2012 中国民营企业 500 强、2012 中国民营企业制造业 500 强、2012 中国民营企业服务业 100 强名单以及 2012 中国民营企业 500 强调研分析报告。湖北枝江酒业股份有限公司以 701041 万元营收总额入选 2012 中国民营企业 500 强,名列第 459 位,比上一年度的第 475 位前进了 16 位。这是湖北枝江酒业自 2009 年以来,连续 4 年蝉联中国民企 500 强,也是 2002 年首次问鼎中国企业 500 强、2005 年再度荣登中国民营企业 500 强之后,第六次上榜。同时,湖北枝江酒业在“中国民营企业制造业 500 强”榜单中,排名第 293 位,比上一年度的第 314 位前进了 21 位。

经历了市场经济洗礼而在民营企业阵营中脱颖而出的湖北枝江酒业,近年来发展突飞猛进。企业规模和效益不断提高,对社会贡献进一步加大,技术创新的主体地位更加突出,特别是不断提高企业管理水平,优化产品结构,转变发展方式,核心竞争力不断提升,连续十年跻身全国同行业十强,成为备受业界和社会大众瞩目的大型白酒企业。2011 年,湖北枝江酒业应对原材料大幅度涨价、生产成本上升和市场竞争加剧等一系列困难和挑战,坚持以打造中国最大的新名酒品牌为战略中心,充分发挥品牌优势,加大技改和人力资源投入,优化市场和产品结构,不断推进规范管理,各项经济指标再创历史新高。销售收入突破 70 亿元,其中白酒主业销售突破 25 亿元,利税破 5 亿元,年纳税额连续十年位居宜昌县属企业和食品饮料行业第一名。

据悉,此次民企 500 强入选门槛为 65.69 亿元。湖北省上榜企业 17 家,与去年持平,占比在全国各省市中排第 6 位,较去年的第 8 位上升 2 位。整体名次大幅提前。宜昌市有 4 家民企入选,除湖北枝江酒业外,还有三峡全通、稻花香排名、东圣化工。(杨至爱)