微生物分子生态学技术应用于大曲酒的微生物学研究

黄祖新
(福建师范大学生物工程学院,福建 福州 350007)

摘 要: 大曲酒酿造是"群微共酵"的过程。以分子生物方法为基础的微生物分子生态学,可通过对微生物的核酸序列片段分析,从基因水平对微生物进行定性和定量研究,直接微观地探讨微生物种群结构、遗传多样性及其与环境间的相互关系,以弄清酿酒微生物在发酵过程中的真实状态,最终揭示酿酒微生物影响大曲酒香型的奥秘。(丹妮)

关键词: 大曲酒; 微生物; 分子生态学技术
中图分类号:TS262.3;TS261.1 文献标识码:A 文章编号:1001-9286(2005)05-0060-04

Application of Microbial Molecular Ecology Techniques in the Research on Microbiology of Daqu Liquor

HUANG Zu-xin
(Bioengineering College of Fujian Normal University, Fuzhou, Fujian 350007, China)

Abstract: The fermentation of Daqu liquor is in fact the process of "co-fermentation of multiple microbes". Molecular ecology developed on the basis of molecular biology. Its application could directly discover microbial groups structure, genetic diversity and the relations of genetic diversity and environments through the analysis of microbial nucleic acid sequence fragment and quantitative & qualitative examination from gene angle. Furthermore, its application could display the real state of microbes during fermentation and finally reveal the effects of microorganisms on Daqu liquor flavours. (Tran. by YUE Yang)

Key words: Daqu Liquor; microorganisms; molecular ecology techniques

大曲酒以生产历史悠久、工艺独特、形成多种香型而著称。大曲酒所涉及的微生物种类十分庞杂,一是大曲的微生物区系;二是酒窖内的微生物区系;三是生产过程(如晾糟或堆积)的环境微生物区系。由于微生物之间存在着互生、共生、寄生、拮抗的关系,在大曲酒生产过程中逐渐形成了一个靠自然给予、异常复杂并与环境相适应的、随着发酵过程消长变化的微生物区系。酿酒原料在微生物的作用下生成各种呈香呈味物质,不同的酿造微生物区系的存在,在很大程度上决定了大曲酒的不同风格。

1 目前微生物学研究存在问题

大曲酒酿造系统所涉及的微生物种类众多繁杂。使用常规的培养基和培养条件进行微生物分离培养研究,将会遗漏很多微生物种类,甚至是对酿造大曲酒十分重要的种类。如检测酒窖内细菌的常规方法是培养活菌落法,不同的类群细菌需要特殊的培养基。这种方法不但费时费力,而且绝大多数细菌不能或很难培养。据统计,通常环境中可培养的细菌不到细菌总数的1%[1]。由此可见,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。

酿造微生物在发酵过程中其生长是处于变化状态,研究微生物生长动态的直接方法需要对基质中的微生物种类数量进行计数。直接镜检计数和平板菌落计数是常用的统计方法。但是,这两种方法无一适合于固态酒醅和窖泥微生物的计数。直接镜检由于固态基质对微生物细胞的吸附、包埋等作用难以计数完全,还因固态基质颗粒对镜检的干扰而分辨困难。培养活菌落由于培养基及培养条件的原因,一些微生物难以培养或不能培养等而导致结果不准确。因此,以目前简单计数的固态基质中微生物数量的测定法是不能准确评判体系中微生物的变化趋势的。

大曲酒生产过程的微生物区系是大曲酒酿造的基础,具有微生物生态的多样性。大曲酒芬香的酒质是由

收稿日期:2005-01-18
作者简介:黄祖新(1956-),男,福建福州人,大学本科,高级工程师,发表论文20余篇。

© 1994-2012 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

种类众多的霉菌、酵母菌、细菌及放线菌综合作用的结果。简单的几种微生物要酿造出风味独特、上乘酒质的大曲酒是难以实现的。但以往对大曲酒酿造微生物的研究主要集中在那些影响生产的模式菌株的分离、筛选、鉴定上，而各种有益微生物之间的相互作用了解甚少，影响大曲酒酒质微量组分的主要微生物相互关系及生理代谢有待于进一步研究。

大曲酒酿造是“群微共酵”的过程，应当了解清楚酿造微生物种群之间的相互关系。繁杂的微生物种群之间相互作用，最终是通过改变单菌种的生理代谢而对酒的质量和产率发生影响。只有在弄清微生物种群的基础上，通过对各自不同菌种代谢途径及产物分别进行研究，有助于全面、准确地认识不同香型白酒风味成分的来源，克服认识上的模糊性和盲目性。有关这方面的研究有待于深入开展。

2 微生物分子生态学技术

近10年来发展起来的以分子生物为基础的微生物分子生态学，它通过对微生物的核酸序列片段分析，从基因水平对微生物进行定性和定量研究，可以直接微观地探讨微生物种群结构、遗传多样性及其与环境间的相互关系。微生物的多样性、系统发育地位、种群结构以及与功能的相关性成为该领域的研究热点。随着微生物分子生态学研究的深入，也开发形成多种多样的微生物分子生态学技术。

2.1 DNA碱基组成（G+C mol %）分析

Tm值法是常用的测定G+C mol %的方法。DNA分子中G和C配对有3个氢键，而A和T间是2个氢键连接。加热使DNA双链分子变性成为单链时，光吸收值（O.D）随温度的升高（DNA氢键的打开）而增加，并最终因所有双链DNA成为单链时吸收值趋于平稳。借助紫外分光光度计测定260 nm处因解链引起的吸收值增加（即增色效应）来完成。从DNA变性曲线得到的Tm值，就可以根据公式计算出G+C mol %。由于一般生物个体的DNA分子中（G+C）/（A+T）两对碱基间的比例是非常稳定的，测定G+C mol %反映着碱基序列及变化，可以用于验证已建立的生物体分类关系是否准确。它已成为细菌分类鉴定的基本方法，并作为描述细菌分类单位的特征之一。

2.2 梯度凝胶电泳技术（DGGE，TGGE）

这项技术利用DNA分子从双螺旋型变成局部变性型时电泳迁移率会下降的现象。通过实施一些变性条件（添加线性梯度的变性剂或建立变性温度梯度等）改变DNA双螺旋结构，由于序列不同的DNA片段存在部分解链程度不同，不同的结构对DNA在凝胶中迁移速率影响很大，结果不同序列的DNA片段在凝胶上得以高分辨率的分离，即能把长度相同但核苷酸序列不同的双链DNA片段分开。自从Myuzer首先将DGGE技术应用于微生物分子生态学后，已证明这类电泳（DGGE，TGGE）是揭示自然环境中微生物群体遗传多样性的有效手段。可用于微生物群落结构的研究、种群动态的分析、富集培养基及分离物的分析、核糖体RNA同源性的分析。

2.3 DNA指纹技术

DNA扩增指纹技术（RAPD）是一种以DNA多态性为基础的分子生物学技术。其基本原理是利用含9~10个不同的碱基顺序随机排列的寡核苷酸为随机引物，将所研究的基因组作为模板，进行体外扩增。由于随机引物的多态性，能够产生足够的DNA多态性，这对于鉴别物种、品种的分类与鉴定、分子遗传标记等提供了有效工具。RAPD技术分析所得到的基因组指纹图谱在比较一段时间内微生物种群的变化，用于探测含有混合微生物种群的各种生物反应器中的微生物多样性。RAPD同一类技术有RFLP分析、DFA分析、LFRFA分析、ARDRA分析、AFLP分析等。这些技术应用于生物的遗传多样性、群体遗传、亲缘关系分析、遗传连锁图的构建、特定基因的标记和定位等研究领域。

2.4 PCR特异性扩增技术

1983年Mullis发明了聚合酶链式反应（PCR）技术。即以一对标定的寡核苷酸片段为引物，在耐热的TaqDNA聚合酶作用下，体外合成特异的DNA片段，将靶序列放大几个数量级。在微生物生态学中应用，使得在复杂环境中对那些混合物内低含量的微生物群体成员或微生物种群中某个特异性基因的检测与研究成为可能。PCR技术给整个分子生物学领域带来一次重大的革命，同时衍生出一系列的生物技术。PCR技术与其他技术结合起来使用，如RT-PCR，竞争PCR，槽式PCR，ARDRA等，对被扩增序列作定性或定量研究分析微生物群体结构。

2.5 16SrRNA原位杂交法

核酸杂交方法是根据具有同源序列的两条DNA单链或DNA与RNA单链在适当条件下能互补地形成稳定的DNA双链或DNA-RNA或RNA-RNA链，如果用具有特殊标记的DNA（或RNA）片段作为探针与微生物的同源DNA(或RNA)杂交，然后对含特殊标记的杂交体进行检测，这样就可以对微生物进行定性和定量研究。核酸杂交法主要有Southern印迹杂交法、Northern印迹杂交法和斑点印迹杂交法等，但由于这些方法需要提取微生物核酸，操作复杂等，一定程度限制了它们作为常规的微生物定性和定量分析。近年来新建立起来的一种核酸杂交法——16SrRNA探针原位杂交法，由于不需要

© 1994-2012 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

培养微生物、提取核酸、PCR 和电泳等，具有方便、快速且准确，已成为微生物定性和定量研究的有效方法。

16SrRNA 探针原位杂交法是指使用已标记的 16SrRNA 探针或寡核苷酸探针（可检测的标记物质如放射性同位素、荧光染料等），根据碱基互补的原理与涂布固定的待测样品中的互补序列在特定条件下结合即杂交，洗去未杂交的探针，放射自显影或使用荧光显微镜进行观察拍照，统计检测结果。检测出的标记物的量可以用来表示与探针结合的 rRNA 量。从而可以得到特定微生物在环境中的存在、分布和丰度，分析整个微生物群落的组成、结构及其多样性，并通过鉴定发现新的微生物物种。

2.6 16SrRNA/DNA 序列同源性分析[3]

该技术主要利用不同微生物在 16SrRNA/DNA 序列上的差异来进行微生物种类的鉴定和定量分析。利用 16SrRNA 基因序列研究有多种方法组合。其中之一是：

环境样品→提取核酸（DNA/RNA）→PCR 扩增→分子指纹技术（DGGE，RFLP 等）→16SrRNA/DNA 测序→序列比较→种群分类或系统发育树分析

环境样品中的微生物 DNA(或 rRNA)提取物通常是不同微生物的 DNA 混合物，经过 PCR 后，其产物是序列等长，但不同源 DNA 片段的混合物。混合物中序列的多样性和不同序列的丰度在一定程度上反映了原始样品中微生物种群的多样性和不同物种的丰度。采用分子指纹技术（如 DGGE，RFLP 等）将上述这些序列等长但不同源 DNA 片段分离开，然后具有代表性回收序列（至少选取 100 个左右）进行测序，并采用正反向引物对所测序列进行重复验证，以确保序列准确性。可以测定 16rRNA 部分序列进行微生物多样性分析和平行样品比较，初步估计环境中微生物的多样性和种群分类；还可以提交到 GENBANK，采用 BLAST 程序进行相似性分析，以确定这些序列相对应的微生物种类；根据反映微生物亲缘关系的 16SrRNA/DNA 的序列同源性计算不同物种之间的遗传距离，然后采用聚类分析等方法，将微生物加以分类或构建系统发育进化树。

3 应用前景

3.1 对酒窖内产甲烷菌微生物的研究

随着对酿酒微生物研究的深入开展，发现了窖泥中不仅存在着厌氧的己酸菌，而且还存在着绝对厌氧产甲烷菌。窖泥质量的优劣，不仅与窖泥中是否存在己酸菌及其数量有关，而且与是否有产甲烷菌及其数量有关。据专家论述[4]，泸型酒窖泥中生态分布规律基本相似的甲烷菌与己酸菌共酵，即己酸菌与产甲烷菌共栖于窖中，甲烷发酵消耗了己酸发酵产生的 H_2，消除了己酸发酵的氢产物抑制，而提高了己酸的产量，进而使浓香酒主体香成分己酸乙酯增加。泸州酒厂、五粮液酒厂的酒窖泥中存在着多种产甲烷菌。但是，关于酒窖内产甲烷菌的微生物学方面的知识人们的了解尚有限，其主要原因是专性厌氧的产甲烷菌培养条件比较苛刻，且生长速率较低。利用 16SrRNA 原位杂交技术非常适用于这类微生物种群的分类及鉴定的研究。

3.2 酿酒微生物的种群群落结构及多样性

长期以来，对于窖池酒醅内微生物种群结构及动态变化缺乏系统深入研究。通过对大曲酒发酵过程中酒醅微生物种群构成及动态变化的研究，为揭示大曲酒不同香型的成因和传统工艺改造提供依据。使用 PCR 与 RFLP 联用方法分析微生物群落结构。可将 PCR 的引物中的一条用荧光染料标记，而另一条不标记。PCR 反应后用适当的限制性内切酶酶切，然后进行琼脂糖或聚丙烯酰胺凝胶电泳分离片段，根据片段的大小不同以及标记片段种类和数量的不同，评价微生物群落结构及多样性。对于比较复杂的微生物群落采用低分辨率的敏感性较好的 DGGE 方法[2]，在区别不同种群的最初调查以及数量上占优势群落的鉴定中是尤其有用的。这种方法可允许多个样品快速初筛，由此提供有关群体变化和差异的信息，并且有利于监测微生物群落的变化。

3.3 量化酿酒微生物体系中微生物群体的成员

大曲酒的发酵是在酿酒微生物的生态环境——酒窖里进行的，含有各种酿酒微生物的酒醅在固体混合发酵条件下酿制成具有典型风格的白酒，其独特的白酒香型是由不同比例的微量香味物质形成，并且香味物质的产生是受微生物种群结构及其变化和不同生产工艺条件所决定。其中特异性的微生物种群的代谢产物起主要作用。大曲酒生产主要微生物有酵母菌、霉菌和细菌。霉菌是糖化的动力，酵母菌是发酵的动力，细菌是生香的动力。茅台高温大曲由于培养高温期温度达 60 ℃以上，霉菌、酵母菌难以在曲坯上生存，所以成品曲中难检出霉菌及酵母菌，成为嗜热芽孢杆菌的天下，可称之为细菌曲[6]。茅台酒的酱香型香味物质的产生与茅台酒的高温大曲中的嗜热细菌种群有关。以往对茅台酒的发酵过程中嗜热细菌种群消长变化的研究是采用分离培养的传统方法，只能进行粗放的定性分析。

利用核酸探针杂交技术对窖泥中微生物群落进行分析，采用特异性核苷酸探针与窖泥中的微生物进行全细胞杂交，再通过荧光显微镜进行定量分析，以发现窖泥中的处于优势地位的微生物。通过不同时间段进行，就得到微生物群落中种群和优势菌变化规律。克服窖泥中固体颗粒多，不用进行繁杂的分离培养，具有灵敏度高且定量准确，特别适合于窖泥中待测微生物含量极低的情况。不但可以精确地对群体中微生物进行直接计

© 1994-2012 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

数，而且还可以同时分析该菌的分布情况，结合提交到GENBANK进行核酸序列相似性分析，确定微生物的种类及发现微生物新种。

3.4 泸型酒功能菌——己酸菌的研究

浓香型大曲酒优良的酒质，与百年老窖有关。窖泥是浓香型白酒功能菌生长繁殖的载体，泥窖中的厌氧环境生长的梭状芽孢杆菌产生己酸与乙醇作用，生成浓香型大曲酒的主体香味物质己酸乙酯。中国科学院成都生物研究所从四川文君酒厂的发酵糟中分离得到SA-1型微好气性己酸菌[5]，该菌在好气条件生长很快，而厌氧状态下则生长极慢，在微氧环境下产己酸量最高。这表明在酒醅环境下同样存在着产己酸能力强的细菌。改变了己酸菌只存在于无氧窖泥环境的传统说法。并且各地所分离的产己酸应用菌种的厌氧情况都不甚明显。因此，产己酸细菌究竟是单一菌还是多菌共栖（如己酸菌与产甲烷菌共栖），产己酸是酒醅为主还是窖泥为主成为难以定论的问题。利用16SrRNA原位杂交技术对产己酸细菌的微生物学研究可以找到答案。首先构建产己酸的梭状芽孢杆菌具有专一性寡核苷酸探针，对酒醅和窖泥进行16SrRNA原位杂交检测，可以较准确地得到酒醅和窖泥样品中的产己酸菌的丰度，检测出酒醅和窖泥中产己酸的优势菌的分布情况，以断定产己酸是以酒醅为主还是窖泥为主。

4 结束语

酿酒微生物是在大曲酒生产过程中富集、驯化而构成、存在于酒窖的微生物区系。由这个特定的微生物区系形成了酒窖环境的微生物生态，不同微生物在这一微生物生态中发挥着各自独特的相互作用，才产生大曲酒如此丰富的香味物质微量成分。加速这个生态的形成和维持这个生态的有规律性的稳定是对酿造大曲酒质量至关重要。首要的工作是了解微生物生态的种群组成及其变化规律。然而，至今人们对大曲酒的微生物种群及生态的认识还很肤浅，这是由于传统研究分析手段的限制。现代分子生物学的突飞猛进的发展，使用分子生物学技术为中国大曲酒的微生物研究提供新的方法和手段。特别是近年来微生物分子生态学技术应用于微生物系统分类和微生物生态研究等领域取得可喜的成果。综合运用多种微生物分子生态学技术手段对酿酒微生物以功能基因为基础的群落结构进行分析，特别要通过研究酿酒微生物的功能基因在酒窖生态环境中的表达调节，以弄清酿酒微生物在发酵过程中的真实状态。随着各种方法学的进一步完善，我们将会逐渐了解到酿酒微生物生态环境中微生物群体多样性及实际的生存状态，最终揭示酿酒微生物影响我国宝贵遗产大曲酒（如茅台酒）的香型奥秘。

参考文献：

[1] Yen R W C, Vertion P M, Nelkin B D, et al. Nucleic Acids Res[J].1992,20(9):2287-2291.

[2] 余利岩，姚天爵.微生物生态学研究方法的新进展[J].微生物学通报，2001，28（）：89-93.

[3 张彤，方汉平.微生物分子生态技术：16SrRNA/DNA方法[J].微生物学通报，2003，30（）：97-101.

[4] 吴衍庸，郭世钊，薛宝荣，等.中国传统酿造泸型酒微生物学研究[J].食品与发酵工业，1993，69（）：30-36.

[5] 沈怡方.白酒生产技术全书[M].北京：中国轻工业出版社，1998.128-142，310-315，357-359.

[6] 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.

（上接第59页）

为了验证所建构模型的可靠性，我们又将文献[7]中402柱上的18种醇、18种酯的 t_R' 分别与 ^0T，^1T 进行了相关分析，结果表明 t_R' 与 ^0T，^1T 间同样存在良好的线性关系。根据式（7）和式（8）得到的计算值与文献测定值基本吻合。

醇 $t_R'=-1.07+0.330^0T-0.0799^1T$ （7）

n=18 R=0.9984 S=0.03329

酯 $t_R'=-1.48+0.267^0T-0.04^1T$ （8）

n=18 R=0.9974 S=0.03967

因此不论是在PEG20M柱上测定的 t_R' 还是文献[7]在402柱上测定的 t_R' 与 ^0T，^1T 均显著相关，这一结果对预测白酒中微量成分的相对保留值将具有一定的理论指导意义。

参考文献：

[1] 戴景辉.白酒香型与风格初探[J]. 酿酒，2000，（）：29-31.

[2] 曾祖训.对白酒香型发展的认识[J]. 酿酒科技，2002，（）：19.

[3] 徐占成.对发展中国白酒行业的思考[J]. 酿酒科技，2001，（）：24-25.

[4] 王令云，刘军，刘娅. 食品香味物质分子连接性指数与其理化性质的相关性[J]. 新疆工学院学报，1998，19(3)：173-177.

[5] 刘春清. 食品香味物质自相关拓扑指数与理化性质的定量关系[J]. 食品与机械，2002，（）：28-29.

[6] 堵锡华. 醇、酸的定量结构与性质/活性相关性[J].化学通报，2001，（）：508-512.

[7] 贡献，陈周平.气相色谱法与白酒分析[M].成都：四川科学技术出版社，1989.157-159.

© 1994-2012 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net