

偏高温大曲发酵过程中芽孢杆菌的演替

江东材,周瑞平,陈云宗,刘超,唐代云,朱和琴

(四川省宜宾市叙府酒业股份有限公司技术中心,四川 宜宾 644000)

摘要: 采用经典微生物学方法和 16S rRNA 基因系统发育分析的方法,对偏高温大曲发酵过程中的芽孢杆菌类群及其演替情况进行了分析。结果表明,在偏高温大曲发酵过程中,芽孢杆菌数量从拌料的 6.0×10^5 个/g 曲快速上升到最大值 3.2×10^7 个/g 曲(第一次翻曲 4 d),最后降低到 1.1×10^6 个/g 曲,芽孢杆菌类群从最初的 3 种增加到 10 种后减少至第一次翻曲时(4 d)的 9 种,随后多样性持续下降,到收曲时仅检测到 6 种。同时发现,在整个发酵过程中 *Bacillus licheniformis* 为绝对优势种,在整个发酵环节中均存在。*Bacillus* 产芽孢的特性保证了其种群的延续性。

关键词: 偏高温大曲; 芽孢杆菌; 演替; 16S rRNA

中图分类号:Q93-3;TS261.1;TS262.3

文献标识码:A

文章编号:1001-9286(2012)09-0062-03

The Succession of *Bacillus* in Luzhou-flavor Daqu in Fermentation Process

JIANG Dongcai, ZHOU Ruiping, CHEN Yunzong, LIU Chao, TANG Daiyun and ZHU Heqin

(Technical Center of Yibin Xufu Liquor Industry Co.Ltd., Yibin, Sichuan 644000, China)

Abstract: *Bacillus* groups and its succession in Luzhou-flavor high-temperature Daqu were analysed by classical microbiology methods and 16S rRNA gene phylogenetic analytic methods. The results showed that the number of bacteria increased rapidly from 6.0×10^5 particle/g (Daqu) in raw materials mixing to the maximum of 3.2×10^7 particle/g (Daqu) in Daqu-turning at the first time (4d later), and then decreased to 1.1×10^6 particle/g (Daqu). *Bacillus* groups increased from 3 groups at the beginning to 10 groups and then decreased to 9 groups in Daqu-turning at the first time (4 d later) and then kept decreasing afterwards and reduced to only 6 groups at the end of Daqu-making. Meanwhile, it was found that *Bacillus licheniformis* was the absolute dominant *Bacillus* species during the whole fermentation process and spore-producing capacity of *Bacillus* could ensure the continuity of bacillus groups.

Key words: Luzhou-flavor Daqu; *Bacillus*; succession; 16S rRNA

中国白酒是世界六大蒸馏酒之一,是我国特有的民族传统产业,亦是我国食品饮料行业中重要的组成部分。曲药在我国白酒行业中普遍使用,主要为白酒发酵提供多种部分发酵菌种和复合酶系^[1],曲药中的微生物群落与白酒的风格、风味、口感及品质的关系极为密切^[2]。偏高温大曲是宜宾叙府酒业股份有限公司自主研发的“一步法”多粮浓酱兼香型白酒生产工艺^[3]中所使用的曲药,其工艺特点为将传统浓香型白酒的中高温大曲的最高品温提高 2~3℃(最高品温 63℃)。芽孢杆菌是大曲中的优势细菌^[4],近年来对大曲芽孢杆菌的研究较多,主要集中在成品曲中功能菌株的分离和检测^[5-7],对偏高温大曲发酵过程中的芽孢杆菌及其演替开展较为系统的研究未见报道。因此,对偏高温大曲发酵过程中芽孢杆菌的演替进行研究有助于对大曲发酵过程的进一步了解,同时,这

些菌株也是潜在资源,在白酒乃至其他行业中具有广泛的应用前景。

1 材料与方法

1.1 材料、试剂及仪器

样品:分别在制曲过程的拌料(0 d)、立曲收汗(0 d)、第一次翻曲(4 d)、第二次翻曲(10 d)、堆烧(18 d)、收曲(40 d)时采集样品。拌料样品为拌和均匀的小麦粉,曲药样品为随机选取的 5 块曲药的四角、曲心、曲包的混合样。

试剂和仪器:PCR 仪为 Bio-Rad 公司产品;菌株 DNA 提取、16S rDNA 片段扩增所用的各种酶、Marker、dNTPs、Buffer 等试剂为上海生物工程技术服务有限公司(Sangon);其余试剂均为国产分析纯。

基金项目:四川省科技厅支撑项目(2010SZ0229),四川省经信委重大产业创新专项(2011YB00275),宜宾市自主创新项目(200905207),宜宾市科技创新专项(2011ZGY009)。

收稿日期:2012-07-10

作者简介:江东材(1985-),男,助理工程师,大学本科,主要从事酿酒微生物、酿酒工艺研究。

通讯作者:周瑞平(1975-),男,工程师,高级技师,宜宾市有突出贡献技师,大学本科,专业从事酿酒微生物、酿酒工艺研究,发表论文多篇。

优先数字出版时间:2012-08-07;地址:<http://www.cnki.net/kcms/detail/52.1051.TS.20120807.1444.001.html>。

1.2 实验方法

1.2.1 芽孢杆菌的分离

采集样品在无菌条件下梯度稀释至 10^{-7} , 稀释液在 90°C 下水浴 10 min, 每个梯度涂布 5 个平皿。

1.2.2 细菌 CFU 计数

培养基为改良的牛肉膏蛋白胨培养基(NA), 具体配制方法参考文献^[4], 计数参考文献^[8]。

1.2.3 分离、纯化

每个样品计数时, 根据菌落形态差异挑选计数平板上菌落, 纯化后保存。

1.2.4 培养物 DNA 提取和 16S rDNA PCR 扩增

根据文献^[10]提供的方法, 提取优势菌及特殊菌基因组 DNA 后, PCR 扩增 16S rDNA。细菌引物 27f: 5'-A-GAGTTTGTATCTGGCTCAG-3' 和 1541 r: 5'-AAG-GAGGTGATCCAGCCGCA-3'^[9]。PCR 反应体系和反应条件参照东秀珠^[12]等的方法进行。

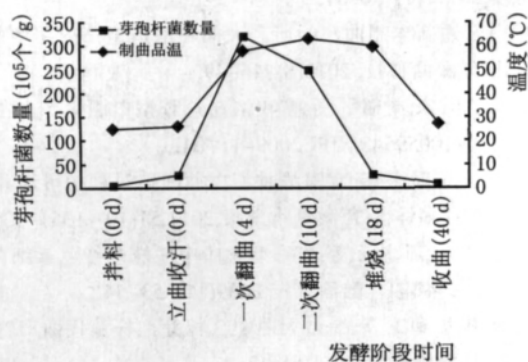
1.2.5 16S rDNA 部分序列分析

扩增的 PCR 产物送上海生物工程技术服务有限公司(Sangon)纯化并测序, 测序长度 1000~1100 bp, 所得序列用 EzTaxon server 2.0^[10] 在线进行相似性分析。用 ClustalX 按照最大同源性的原则进行排序, 采用 Kimura-2^[11] 计算核苷酸差异值, 并用 BioEdit 5.0.9 进行检验, 最后用 Neighbor-Joining 法^[12] 构建系统进化树, 自展数(bootstrap)为 1000。

2 结果与分析

2.1 偏高温大曲发酵过程中芽孢杆菌数量变化

对曲药发酵过程中芽孢杆菌的数量及制曲品温变化进行跟踪分析, 结果见图 1。



注: 横坐标是以发酵过程工艺阶段时间为准。

图1 曲药发酵过程中芽孢杆菌数量及制曲品温变化

从图 1 可以看出, 偏高温大曲中芽孢杆菌数量在发酵的不同阶段呈现先增加、后降低的变化趋势。拌料阶段芽孢杆菌数量较少(6.0×10^5 个/g 曲), 通过短暂的立曲收汗数量即增加了约 3 倍, 达到 2.8×10^6 个/g 曲; 经过 4 d 发酵, 到第 1 次翻曲时达到峰值(3.2×10^7 个/g 曲);

随后数量开始下降, 到第 2 次翻曲(10 d)时达到 2.5×10^7 个/g 曲; 此后急剧降低, 到堆烧和收曲阶段, 芽孢杆菌数量仅分别为峰值的约 1/10 和 1/30, 与拌料和立曲收汗时的数量接近。

在拌料阶段, 尽管曲药中接种了来自原料、水源、工具、场地及人工带入的大量芽孢杆菌, 但此时并未增殖, 使得其数量低。随着发酵的进行, 各类芽孢杆菌大量繁殖导致数量不断增加, 但同时曲药温度也在不断上升, 在第一次翻曲时, 曲药的温度接近最高点时(芽孢杆菌数量达到最高点时的品温为 58°C)芽孢杆菌数量达到顶峰。随后, 从第一次翻曲至堆烧长达 14 d 的时间内, 曲药温度一直维持在顶温附近($60 \sim 63^{\circ}\text{C}$), 加之发酵后期水分的大量挥发损失(水分 $< 15\%$)和微生物代谢物的积累, 曲药中的环境愈发不适合大多数芽孢杆菌的生长, 导致其数量急剧下降。

2.2 偏高温大曲发酵过程微生物类群的演替

2.2.1 各样品中获得的纯培养物

经去除冗余, 从不同样品的计数平板上分离得到 64 株纯培养物, 其中拌料 4 株, 立曲收汗 14 株, 一次翻曲 16 株, 二次翻曲 15 株, 堆烧时取 10 株, 收曲时取 8 株。

2.2.2 纯培养物的系统发育分析

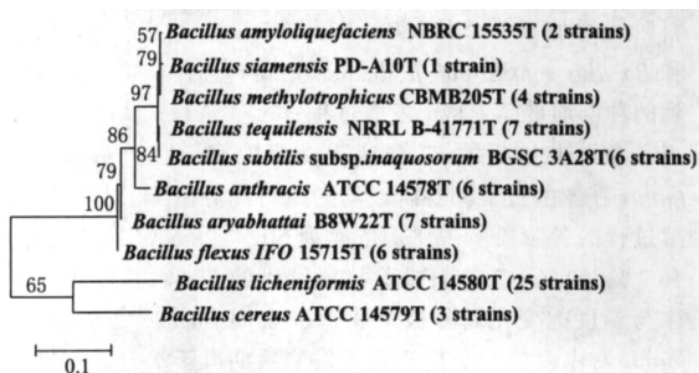


图2 66 株纯培养物基于 16S rRNA 基因序列的系统发育树

按照 16S rDNA 序列系统发育分析的相关理论^[13-14]并结合图 2 可以看出, 分离得到的 67 株芽孢杆菌呈现出较为丰富的系统发育多样性。除 1 株菌与 *Bacillus flexus* 的相似度为 96.3%, 可能是 *Bacillus* 属的一个潜在新菌种外, 其余 66 株菌与 GenBank 中 *Bacillus* 的 10 个种的模式菌株序列的相似度 $\geq 98\%$ 。其中 *Bacillus licheniformis* 25 株, 占 37.3%, 为绝对优势菌种。

从表 1 可以看出, 拌料时检测到 *Bacillus* 的 3 个种类群, 拌料、踩曲完成后进入曲房中立曲收汗后, 曲药中可培养的芽孢杆菌的多样性大幅度增加, 检测到的种群多样性达到整个发酵过程的最大的 10 个种, 较拌料阶段多出 7 个种的类群, 这表明, 人工踩曲和立曲收汗这 2 个制曲环节(工艺)对于偏高温大曲发酵体系中芽孢杆菌接种具有重要作用; 同时, 亦表明曲房环境中存在对大曲生

表 1 偏高温大曲发酵过程中芽孢杆菌的演替情况

属名	种名	拌料	立曲收汗	一次翻曲	二次翻曲	堆烧	收曲	总数
<i>Bacillus</i>	<i>B. licheniformis</i>	2	4	5	7	4	3	25
	<i>B. aryabhattai</i>	1	1	2	1	1	1	7
	<i>B. anthracis</i>		1	1	2	1	1	6
	<i>B. flexus</i>		2	1	1	1	1	6
	<i>B. amyloliquefaciens</i>		1	1				2
	<i>B. tequilensis</i>	1	1	2	1	1	1	7
	<i>B. siamensis</i>		1	—				1
	<i>B. cereus</i>		1	1	1			3
	<i>B. methylotrophicus</i>		1	1	1	1		4
	<i>B. subtilis</i> subsp. <i>inaquosorum</i>		1	2	1	1	1	6
	菌株数	4	14	16	15	10	8	67
	种数	3	10	9	8	7	6	10

产具有重要作用的芽孢杆菌类群。一次翻曲时种群多样性较拌料阶段少 1 个种(*Bacillus siamensis*),二次翻曲阶段较拌料阶段减少 2 个种(*Bacillus siamensis* 和 *Bacillus amyloliquefaciens*),堆烧时较拌料阶段减少 3 个种(*Bacillus siamensis*、*Bacillus amyloliquefaciens* 和 *Bacillus cereus*),一次翻曲至堆烧品温均处于中挺期(60~63℃),且堆烧后水分低于 15%,表明温度和水分对芽孢杆菌种群的保留作用影响较小,主要是影响其数量的减少。收曲时检测到 6 个种,较一次翻曲时减少了 4 个种,较拌料阶段增加了 3 个种(*Bacillus anthracis*、*Bacillus flexus* 和 *Bacillus subtilis* subsp. *inaquosorum*),且拌料阶段分离到的种群均贯穿于整个发酵过程。

在总共分析的 67 株芽孢杆菌中,*Bacillus licheniformis* 在发酵过程的各阶段均为绝对优势菌株。其在发酵过程的各阶段所占比例依次为 50%、28.6%、31.3%、46.7%、40%、37.5%,排除拌料阶段的 50%,其变化规律与温度的变化趋势极为相似,表明 *Bacillus licheniformis* 对温度的耐受性较强,发酵后期由于水分的大量挥发损失(水分<15%)和微生物代谢物的积累,曲药中的环境愈发不适合大多数芽孢杆菌的生长,是导致各类芽孢杆菌数量减少的原因,但其产芽孢的特性保证了其种群的延续性。

3 结论

采用经典微生物学方法和 16S rRNA 基因系统发育分析的方法,对偏高温大曲发酵过程中的芽孢杆菌类群及其演替情况进行了分析。结果显示,在偏高温大曲发酵过程中,芽孢杆菌数量从拌料的 6.0×10^5 个/g 曲快速上升到最大值 3.2×10^7 个/g 曲(第 1 次翻曲,4 d),最后降低到 1.1×10^6 个/g 曲;芽孢杆菌类群从最初的 3 种增加到 10 种后减少至第一次翻曲时(4 d)的 9 种,随后多样性持续下降,到收曲时仅检测到 6 种。同时发现在整个发酵过程中 *Bacillus licheniformis* 为绝对优势种,在整个发

酵环节中均存在。*Bacillus* 产芽孢的特性保证了其种群的延续性。

尽管周新虎等对江苏洋河大曲(成品曲)中细菌分离到 6 个芽孢杆菌种且均在此次研究中分离到,最大的区别在于其没有分离到 *Bacillus licheniformis*,可能是地域性和制曲工艺的不同所造成的结果。本研究与张春明^[16]等的研究结果较为接近,从高温大曲中分离到的芽孢杆菌主要以地衣芽孢杆菌、蜡状芽孢杆菌、枯草芽孢杆菌为优势菌,其高温大曲的最高品温为 65℃,通过分析发现其制曲工艺与本公司较为接近(特别是品温较为接近),但制曲环境及细菌培养条件的不同导致了两者存在一定的差异。通过以上分析表明,提高了品温的一步法多粮兼香型白酒生产使用的偏高温大曲中芽孢杆菌在曲药发酵过程中起着关键性的作用。

参考文献:

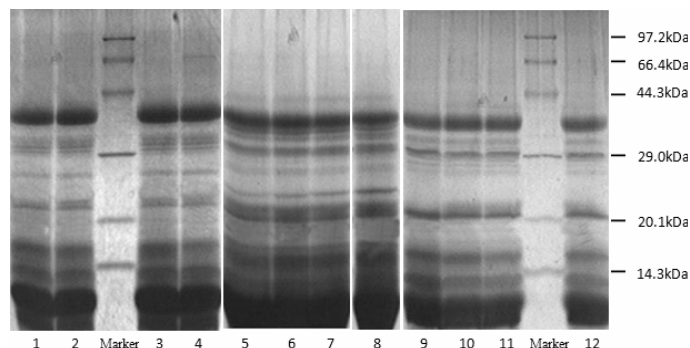
- [1] 张肇敏,吴生文,林培.大曲培养过程微生态变化规律研究[J].酿酒科技,2011(11):30-31.
- [2] 马群.白云边新老制曲车间所产大曲在酿造生产应用中的效果对比[J].酿酒科技,2010(8):46-49.
- [3] 陈泽军,陈云宗,周瑞平,等.多粮浓酱兼香型白酒生产方法:中国,ZL200910059543.X[P].2009-11-04.
- [4] 王涛,赵东,田时平,等.宜宾浓香型白酒酿造过程中可培养细菌的系统发育多样性[J].微生物学报,2011,51(10):1351-1357.
- [5] 赵东,牛广杰,彭志云,等.浓香型大曲中一株产红色素细菌的分离和初步鉴定[J].酿酒科技,2009(11):53-54.
- [6] 杨帆,林琳,王和玉,等.茅台大曲中 3 株芽孢杆菌代谢产物的比对分析[J].酿酒科技,2011(8):42-43.
- [7] 施小明,徐岩,崔凤元,等.枯草芽孢杆菌在白酒生产中的应用[J].酿酒科技,2012(2):49-53.
- [8] Avila CL, Bravo Martins CE, Schwan RF. Identification and characterization of yeasts in sugarcane silages[J].Appl Microbiol,2010,109(5):1677-86.
- [9] Brosius J, Dull TJ, Sleeter DD. Gene organization and primary structure of a ribosomal DNA operon from *Escherichia coli*[J].J Mol Biol,1981,148:107-127.

(下转第 67 页)

10 mg/L 浓度实验组最低,为 461.3 $\mu\text{g/g}$ 。

2.2 大麦发芽过程添加激素对抑菌蛋白分泌量 SDS-PAGE 分析

从添加 3 种外源植物激素溶液样品提取抗菌蛋白,其 120 h 抗菌蛋白 SDS-PAGE 图谱见图 4。



注:泳道 1-4、5-8、9-12 分别为赤霉素(GA_3)、脱落酸(ABA)、细胞分裂素(6-BA)浓度从低到高 4 组样品蛋白。

图 4 120 h 抗菌蛋白 SDS-PAGE 图谱

由图 4 可看出,从添加 3 种外源植物激素溶液样品中所提取的抗菌蛋白条带位置基本相同,分子量大约在 40 kDa 与 16 kDa 之间。分子量为 40 kDa 的蛋白是蛋白质^[1],分子量为 16 kDa 的蛋白是 Ns-LTP^[13],二者均有抗菌活性,能够有效抑制真菌生长。还有硫堇、植物防卫素等成分,由于它们分子量较小(5 kDa 左右),所以在电泳图上没有显示出来,15 kDa 分子量以下的条带大部分为大麦淀粉酶抑制剂^[14],其余为杂蛋白。

3 结论

制麦过程中添加赤霉素已经成为成熟工艺,但其他植物激素对大麦抗菌蛋白影响的研究目前很少。不同浓度的赤霉素(GA_3)、脱落酸(ABA)、细胞分裂素(6-BA)能够影响大麦的发芽进程,对大麦抗菌蛋白含量产生影响,0.05 mg/L 的赤霉素(GA_3),20 mg/L 的脱落酸(ABA),20 mg/L 的细胞分裂素(6-BA),能使大麦抗菌蛋白含量提高,分别可达 566.6 $\mu\text{g/g}$ 、514.9 $\mu\text{g/g}$ 、484.4 $\mu\text{g/g}$,与空白对照组相比,提高 11.1%、4%、3.1%;0.5 mg/L 的

GA_3 , 40 mg/L 的 ABA、10 mg/L 的 6-BA 能够有效降低大麦抗菌蛋白含量,这为减轻大麦抗菌蛋白从而减少对酵母发酵过程的影响提供了一个新的思路。

参考文献:

- [1] Gorjanović S, Sužnjević D, Beljanski M, et al. Effects of lipid transfer protein from malting barley on brewers yeast fermentation[J]. Inst. Brew, 2004, 110: 297-302.
- [2] Kenneth A L, Graham G S, Ian P M. Beer polypeptides and silica gel. Part . Polypeptides involved in foam formation[J]. Journal of the Institute of Brewing, 2003, 109(1): 73-79.
- [3] Boutrot F, Guirao A, Alary R, et al. Wheat non-specific lipid transfer protein genes display a complex of expression in developing seeds[J]. Biochim Biophys Acta, 2005, 1730(2): 114-125.
- [4] 张增艳,陈洋,邵艳军.植物激素调控植物防御反应的研究进展[J].作物杂志,2009(6): 13-16.
- [5] 李文琴,贺长征,阎富英,等.植物生长调节剂与抗生素在种子处理中的应用[J].天津农业科学,2002,8(2): 31-34.
- [6] 李珊,官斌,荀娟,等.制麦过程中添加金属离子与赤霉素对大麦发芽过程淀粉酶系影响的研究[J].食品与发酵工业,2009,35(1): 82-86.
- [7] 姜晓雷,韩丹,李明达,等.几种麦芽抗酵母菌粗蛋白含量比较及性质分析[J].食品工业科技,2011(2): 112-114.
- [8] Bradford M M, A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding[J]. Anal Biochem, 1976, 72: 248-254.
- [9] 郭尧君.蛋白质电泳试验技术[M].北京:科学出版社,2005: 58-76.
- [10] 钱静亚,肖香,黄达明,等.赤霉素对发麦制麦特性的影响[J].中国酿造,2009(4): 38-42.
- [11] 刘璞,陈珈.植物激素脱落酸的信号转导[J].植物生理学通讯,2000,36(2): 165-166.
- [12] 王三根.细胞分裂素在植物抗逆和延衰中的作用[J].植物学通报,2000,17(2): 121-126.
- [13] Gorjanović S, Spillner E, Beljanski M, et al. Malting Barley Grain Non-specific Lipid-Transfer Protein (ns-LTP): Importance for Grain Protection[J]. Inst Brew, 2005, 111(2): 99-104.
- [14] 孙俊,徐凯,孙丽华,等.四种大麦间泡沫蛋白质含量差异的比较[J].食品科学,2009,30(3): 180-183.

(上接第 64 页)

- [10] Kimura M. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences[J]. J Mol Evol, 1980: 111-120.
- [11] Saitou N, Nei M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees[J]. Mol Biol Evol, 1987: 406-425.
- [12] Stackebrandt E, Ebers J. Taxonomic parameters revisited: tarnished gold standard[J]. Microbiol Today, 2006, 33: 152-155.
- [13] Devereux R, He S H, Doyle C L et al, 1990. Diversity and origin of *Desulfovibrio* species: phylogenetic definition of a family

- [J]. Bacteriol, 172(7): 3609-3619.
- [14] Vaishampayan P, Miyashita M, Ohnishi A et al; Description of *Rummeliibacillus stabekissi* gen. nov., sp. nov. and reclassification of *Bacillus pycnus* Nakamura et al. 2002 as *Rummeliibacillus pycnus* comb. nov. [J]. Int J Syst Evol Microbiol, 2009, 59(5): 1094-1099.
- [15] 周新虎,陈翔,李燕荣,等.洋河大曲主要菌系的研究[J].酿酒科技,2011(9): 56-59.
- [16] 张明春,曹敬华,向苇,等.白云边酿酒大曲微生物分析研究[J].酿酒科技,2010(2): 65-67.