

清香型小曲白酒中微生物组成及功能微生物的分析

王海燕¹ 唐洁¹ 徐岩¹ 刘源才² 杨强² 王喆² 杨生智² 李燕群² 李锐利² 管莹²

(1. 食品科学与技术国家重点实验室, 江南大学生物工程学院, 江苏 无锡 214122; 2. 劲牌有限公司, 湖北 大冶 435100)

摘要: 将 PCR-DGGE 技术和传统微生物培养方法相结合, 分析清香型小曲白酒的微生物群落结构及功能微生物。小曲和酒醅中优势微生物种属基本一致。不同季节酒醅中微生物组成无明显变化, 但微生物生长和消亡规律存在差异。小曲酒中细菌的种类较多, 主要以乳酸菌和芽孢杆菌属为主, 但对小曲白酒风味特征影响很小。酵母类主要包括 *Saccharomycopsis fibuligera*、*Pichia anomala*、*Issatchenkia orientalis* 和 *Saccharomyces cerevisiae*。*S. cerevisiae* 的作用是酒精发酵产生乙醇, *Sp. fibuligera*、*P. anomala* 和 *I. orientalis* 是产酯酵母, 增加酒体酯香味。霉菌种类相对较少, *Rhizopus oryzae* 是主要糖化菌。

关键词: 清香型小曲白酒; 微生物组成; 功能微生物; PCR-DGGE; 微生物培养

中图分类号: TS262.3; TS261.4; Q93-3; TS261.1 文献标识码: A 文章编号: 1001-9286(2012)12-0048-05

Analysis of Community Structure of Microbes and Functional Microbes in Fen-flavor Xiaoqu Liquor

WANG Haiyan¹, TANG Jie¹, XU Yan¹, LIU Yuancan², YANG Qiang², WANG Zhe²,

YANG Shengzhi², LI Yanqun², LI Ruili² and GUAN Ying²

(1. State Key Lab of Food Science and Technology, School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi, Jiangsu 214122;

2. Jingpai Co. Ltd, Daye, Hubei 435100, China)

Abstract: The community structure of microbes and functional microbes in Fen-flavor Xiaoqu liquor were analyzed through the combination of PCR-DGGE and culturing-dependent methods. It was found that dominant microbial species in Xiaoqu were almost the same as that in fermented grains, there was no evident change in the composition of microbes in fermented grains in different seasons, however, there was certain difference in the growth and the decline for microbes. Lactic acid bacteria and bacillus were the main bacteria groups in Xiaoqu but played little roles in the formation of Xiaoqu styles and Xiaoqu flavor. Yeasts mainly included *Saccharomycopsis fibuligera*, *Pichia anomala*, *Issatchenkia orientalis* and *Saccharomyces cerevisiae*. The role of *S. cerevisiae* was to produce ethanol, the role of *Sp. Fibuligera*, *P. anomala*, and *I. orientalis* was to produce esters. The varieties of mould were comparatively less and *Rhizopus oryzae* was the predominant saccharifying mould.

Key words: Fen-flavor Xiaoqu; community structure; functional microbes; PCR-DGGE; culturing-dependent method

白酒作为一类历史悠久的中国传统发酵食品, 多采用酵母、霉菌和细菌等微生物进行固态、混菌发酵而成。但对其酿造过程中微生物群落的分析、风味及功能性物质的形成和累积机制的研究相对滞后, 对传统工艺的机理也不甚明确。究其原因, 主要是对发酵过程中微生物种群结构的变化情况以及功能微生物的了解不清楚, 并造成了生产工艺改动的盲目性。

20世纪80~90年代起, 对于微生物的研究, 由过去的微生物个体的研究转向整个生态系统中微生物多样性的研究, 即一个集合群落中, 众多不同类型微生物的变化及它们之间相对的丰度。随着分子生物学技术发展而兴

起的分子生态学方法, 在研究微生物生态系统时具有鲜明的优势。这些方法包括多种“宏”组学, 它们克服了微生物培养技术的限制, 能够分析复杂体系中微生物的种类、分度、分布和功能。

聚合酶链式反应-变性梯度凝胶电泳 (Polymerase Chain Reaction-Denaturing Gradient Gel Electrophoresis, PCR-DGGE) 具有不需培养、检测限低、检测速度快、成本低、结果准确可靠、可同时分析多种微生物等优点, 被广泛应用于各种复杂生态系统, 包括酿造酒、发酵肉类、发酵蔬菜、发酵乳制品等传统发酵食品微生物生态的研究^[1]。与传统微生物研究方法相结合, 能全面揭示复杂混

收稿日期: 2012-08-16

作者简介: 王海燕(1977-), 女, 江苏人, 讲师, 博士研究生, 研究方向为环境微生物分子生态学。

通讯作者: 徐岩, 教授, 博士生导师, yxu@jiangnan.edu.cn。

优先数字出版时间: 2012-10-15; 地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/52.1051.TS.20121015.1038.002.html>。

菌体系中微生物的组成及其功能。

清香型小曲白酒具有以乙酸乙酯为主体的协调复合香气,体现出清香纯正、入口微甜、香味悠长、落口干脆、微有苦味等风格特点^[2]。但清香型小曲白酒口味简单,酒的品质和口感不如大曲白酒丰富。这主要是由于其制曲和酿造工艺,使小曲白酒生产中微生物相对简单。本研究将 PCR-DGGE 技术与培养方法相结合,确定清香型小曲酒生产体系中微生物组成及功能微生物。

1 材料与方法

1.1 材料

2009~2010 年从湖北清香型小曲白酒厂采集了生产用曲和酒醅。

小曲分别是种曲、成品土曲。

共采集了 4 个不同季节的酒醅样品:第 1 批(夏季),发酵时间为糖化醅,发酵 1 d、2 d、3 d、4 d、5 d;第 2 批(秋季),糖化 12 h、24 h 和入池发酵 1 d、2 d、3 d、4 d、5 d、6 d;第 3 批(冬季),糖化 24 h,发酵 1 d、2 d、3 d、4 d、5 d、6 d;第 4 批(春季),分别为糖化醅,发酵 1 d、2 d、3 d、4 d、5 d 和 6 d。

1.2 实验方法

1.2.1 分子生态学技术分析清香型小曲白酒生产体系中微生物群落结构

将采集的曲/醅样品直接提取基因组 DNA,用 3 对引物(P2/P3)、(NL1-GC/LS2)、(NS1/GC-fung)分别扩增细菌 16S rRNA 基因 V3 区、酵母 26S rRNA 基因 D1 区、真菌 18S rRNA 基因。用点突变检测系统(Bio-rad)电泳分析 PCR 产物,并切胶回收、鉴定主要 DNA 条带^[3]。

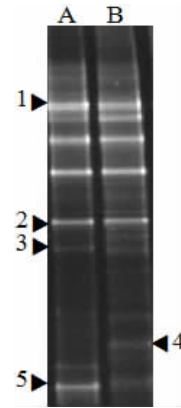
1.2.2 传统微生物培养方法分析清香型小曲白酒生产体系中微生物组成

取 2 g 样品置于装有 100 mL 无菌水并带玻璃珠的三角瓶中,200 r/min 振荡 30 min 后静置澄清。吸取 1 mL 菌悬液进行系列稀释。将合适梯度的稀释液分别涂布于肉汤培养基、麦芽汁培养基和马铃薯浸汁培养基平板上,每个样品平行涂布 2 块,于 30 °C 或 37 °C 培养 1~2 d,分别筛选细菌、酵母和霉菌。将筛选到的细菌、酵母和霉菌菌株分别纯化、提取单菌株基因组,用细菌通用鉴定引物(27F/1492R)、酵母通用鉴定引物(NL1/NL4)和(18SF/18SR)扩增细菌 16S rRNA 基因、酵母 26S rRNA 基因、霉菌 18S rRNA 基因片段。PCR 产物送上海生物工程有限公司测序,测序结果在 GenBank 数据库中进行 blast 比对。

2 结果与分析

2.1 小曲中微生物组成的分析

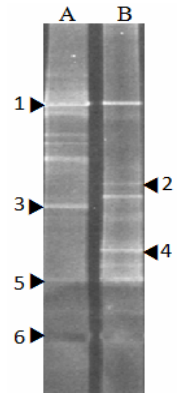
对 2 种曲中的细菌、酵母菌、真菌进行分析,结果见图 1~图 3。



A.种曲 B.土曲

1.*Weissella cibaria*; 2.*Virgibacillus sp.*; 3.*Uncultured Oceanobacillus sp.*; 4.*Enterobacteriaceae bacterium*; 5. *Staphylococcus xylosum*

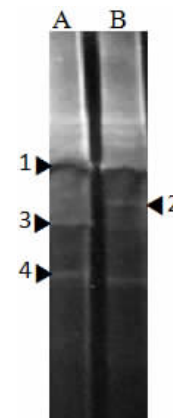
图 1 DGGE 分析曲中细菌的组成



A.种曲 B.土曲

1.*Saccharomycopsis fibuligera*; 2.*Candida tropicalis*; 3.*Pichia anomala*; 4.*Pichia guilliermondii*; 5.*Symbiotaphrina buchneri*; 6.*Saccharomyces cerevisiae*

图 2 曲中酵母群落的 DGGE 分析



A.种曲 B.土曲

1.*Rhizopus. oryzae*; 2.*Amylomyces rouxii*; 3.*Candida allociferrii*; 4.*Aspergillus terreus*

图 3 曲中真菌群落 DGGE 图谱

根据图1,种曲中存在 *W. cibaria*、*L. fermentum*、*Clostridium*、*Pseudomonas*、*Enterobacteriaceae*、*B. megaterium* 等细菌,其中前4种为优势细菌菌种。由于从种曲到土曲的制备过程,还会从空气、接触的生产用具上接种新的微生物,所以土曲中的细菌比种曲丰富。而且乳酸菌和芽孢杆菌都是大曲和小曲中的主要细菌类群^[4-6]

根据图2和图3,由于在制备种曲时接种了 *Sa. cerevisiae*,致使种曲中 *Sa. cerevisiae* 成为绝对优势的酵母,其他酵母应是来源于环境,其数量相对较少。种曲和土曲中霉菌的种类较少,都检测到 *Rhizopus oryzae*,且为优势霉菌。

用PCR-DGGE技术分析小曲,检测到的微生物种属与已报道的大曲中微生物一致。但与大曲相比,小曲中微生物组成较为简单,为揭示小曲中的功能微生物提供了便利。但曲中微生物将在酒醅中继续繁殖,形成特异性的微生物菌群,才能生产出特定风格的产品。因此,需继续跟踪发酵过程中微生物的演变规律,才能更准确地判断小曲中的功能微生物。

2.2 清香型小曲发酵时微生物组成及季节气候对其的影响

酒醅发酵是白酒生产中重要的阶段。但目前白酒生产仍采用传统工艺,窖池发酵依靠地温控制,未外连控温装置。外界温度变化,将通过改变地温而影响酒醅的温度,进而影响微生物的繁殖。比较四季中酒醅内微生物群落结构的差异,分析环境温度对微生物组成的影响,确定发酵中的主体、功能微生物,为改良生产工艺、调控微生物组成,提供一定的理论基础。

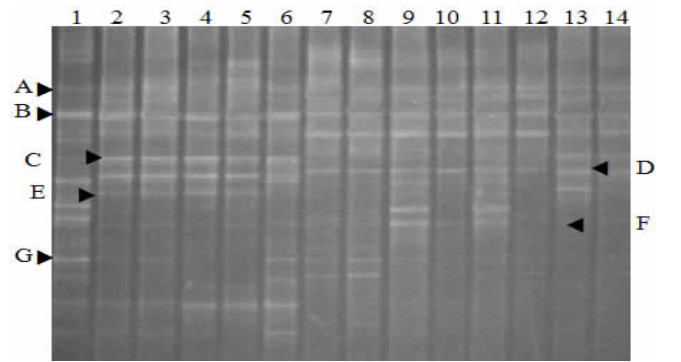
2.2.1 发酵体系中细菌组成的解析

酒醅中细菌的种类较丰富,四季酒醅中检测到的种属基本一致。虽然不同季节的细菌组成存在一定的差异,但都具有一个共同的变化趋势(见图4、图5)。发酵起始时细菌的种类最多,但由于发酵时间的延长,使窖池内微环境发生变化如含氧量、pH值等降低,抑制了不适应特殊环境细菌的生长,使酒醅样品中细菌的多样性呈下降的趋势。

2.2.2 发酵过程中酵母组成的分析

对不同酒醅样品中的酵母组成进行分析,结果见图6、图7。

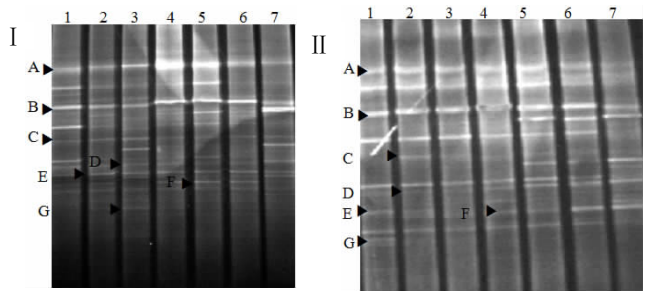
由图6、图7可见,酒醅中主要的酵母是 *Sp. fibuligera*、*Sa. cerevisiae*、*P. anomala*。不同季节酒醅中,这3种酵母在发酵过程中的数量变化存在差异。*S. cerevisiae* 一直存在于整个发酵过程中,入池发酵起始占整个酵母类群的15%~20%,发酵结束时已占到酵母总量的60%~70%,是酒醅中最主要的酵母菌;*Sp. fibuligera* 是第2



1~6:糖化醅、夏季1~5 d发酵酒醅;7~14:秋季糖化12 h、24 h和1~6 d发酵酒醅

A: *W. cibaria*; B: *S. gallinarum*; C: *L. panis*; D: *Virgibacillus sp.*; E: uncultured *Oceanobacillus sp.*; F: *Pseudomonas sp.*; G: *Enterobacteriaceae*

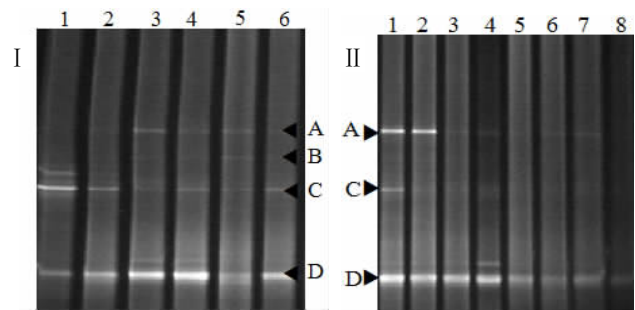
图4 夏季和秋季酒醅样品中细菌的组成



□:糖化醅、发酵1~6 d酒醅; □:糖化醅、发酵1~6 d酒醅

A: *W. cibaria*; B: *S. gallinarum*; C: *L. crustorum*; D: *Virgibacillus sp.*; E: *Acinetobacter calcoaceticus*; F: *Uncultured Oceanobacillus sp.*; G: *Pseudomonas sp.*

图5 冬季(□)和春季(□)酒醅样品中细菌的组成



□:糖化醅、夏季发酵1~5 d酒醅; □:秋季糖化12 h、24 h和入池1~6 d发酵酒醅

A: *Sp. fibuligera*; B: *C. tropicalis*; C: *P. anomala*; D: *Sa. cerevisiae*

图6 夏季(□)和秋季(□)酒醅样品中酵母的组成

大类酵母菌种,在春季时一直维持在较高的水平,占酵母组成的20%~30%,其他3个季节虽然随发酵进程而逐渐衰亡,但也维持在10%左右;*P. anomala* 是第3位的优势菌种,夏季发酵中能达到酵母总量的10%~20%,但春、冬季发酵时基本未被检测到。总体上,春季和冬季酒

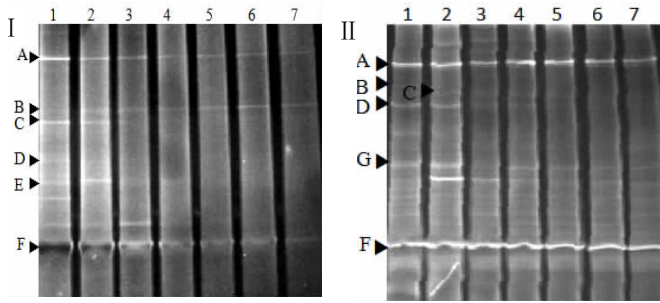


图7 冬季()和春季()酒醅中的酵母组成
 :糖化醅、发酵1~6 d 酒醅; :糖化醅、发酵1~6 d 酒醅
 A: *Sp. fibuligera*; B: *C. tropicalis*; C: *P. anomala*; D: *Arxula adeninivorans*; E: *Trichomonascus ciferrii*; F: *Sa. cerevisiae*; G: *P. guilliermondii*

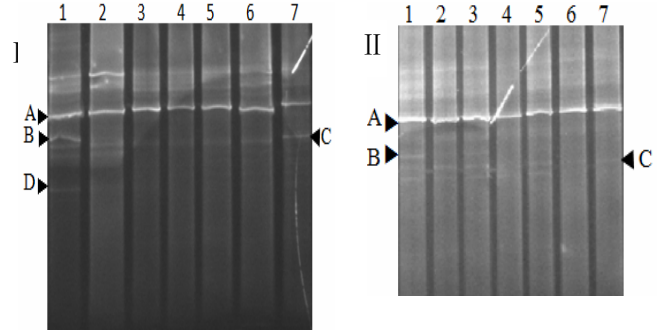


图9 冬季()和春季()酒醅中的霉菌组成
 :糖化醅、发酵1~6 d 酒醅; :糖化醅、发酵1~6 d 酒醅
 A: *R. oryzae*; B: *Am. rouxii*; C: *C. allociferii*; D: *As. terreus*

醅中酵母种类多于夏、秋季节。

2.2.3 分析发酵过程中真菌组成

相对酒醅样品中其他两大类微生物,检测到的霉菌种类相对较少(见图8、图9),仅在发酵初期能检测到 *Am. rouxii*、*As. terreus* 等其他霉菌。*R. oryzae* 作为优势菌,存在于不同季节酒醅样品中。随着发酵时间的延长, *R. oryzae* 所占比例不断增加,可由发酵起始真菌总量的约40%升至70%。其余霉菌在发酵体系中数量极少。

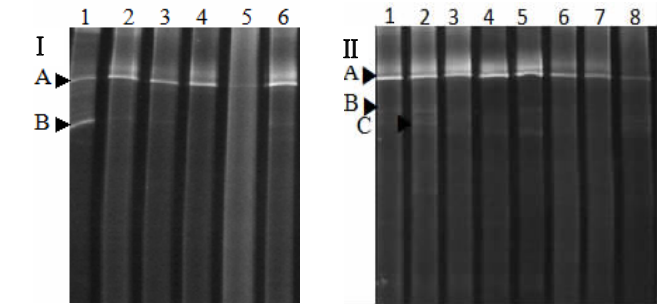


图8 夏季()和秋季()酒醅样品中霉菌的组成
 :糖化醅、夏季发酵酒醅1~5 d; :秋季糖化12 h、24 h 和入池1~6 d 酒醅
 A: *R. oryzae*; B: *Am. rouxii*; C: *C. allociferii*

2.3 采用传统微生物研究方法分析曲/醅中微生物组成

通过选择合适的培养基进行微生物的分离、纯化、鉴定,是掌握体系中现有条件下可以培养的微生物组成的有效手段。利用细菌、酵母、霉菌基本培养基,从劲酒土曲和酒醅中分离微生物,共获得6株细菌、10株酵母和8株霉菌。微生物鉴定结果见表1。

根据表1,从酒醅中分离获得的细菌主要是 *Bacillus* 属,酵母共有4个属(*Saccharomycopsis*、*Pichia*、*Issatchenkia*、*Saccharomyces*),霉菌包括5个属(*Rhizopus*、*Aspergillus*、*Absidia*、*Mucor*、*Amylomyces*)。清香型大曲白酒中细菌有芽孢杆菌、乳酸菌、醋酸菌三大类,由于仅用细菌基本培养基常规培养,所以遗漏了培养条件较为苛

表1 细菌、酵母和霉菌的鉴定结果

项目	编号	GenBank 中比对结果	序列相似性 (%)
细菌	J1	<i>Bacillus megaterium</i> (EU333886.1)	99
	J2	<i>Escherichia coli</i> (AM236323.1)	98
	J3	<i>Bacillus subtilis</i> (GU323376.1)	99
	J4	<i>Bacillus subtilis</i> (EU489517.1)	99
	J5	<i>Bacillus subtilis</i> (EF472262.1)	99
	J6	<i>Bacillus licheniformis</i> (GQ375243.1)	100
酵母	Y4	<i>Saccharomycopsis fibuligera</i> (AB550105.1)	100
	Y6	<i>Pichia anomala</i> (JN180959.1)	100
	Y8m	<i>Issatchenkia orientalis</i> (JN180960.1)	100
	Yqq3#	<i>Pichia fabianii</i> (DQ377651.1)	99
	Yqq1#	<i>Issatchenkia orientalis</i> (EF585438.1)	100
	Yq	<i>Saccharomycopsis fibuligera</i> (HM107787.1)	100
	Y清2	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (JN180958.1)	99
	Z5	<i>Issatchenkia orientalis</i> (HM123747.1)	100
	Z13	<i>Issatchenkia orientalis</i> (JN248607.1)	99
	Z14	<i>Issatchenkia orientalis</i> (EF126363.1)	98
霉菌	G4	<i>Rhizopus oryzae</i> (JN939008.1)	99
	G2-2	<i>Rhizopus oryzae</i> (AY054697.1)	99
	M1	<i>Absidia corymbifera</i> (AF113408.1)	99
	M2	<i>Mucor indicus</i> (AY054699.1)	99
	M3	<i>Aspergillus clavatus</i> (AB008398.1)	99
	清C	<i>Rhizopus oryzae</i> (EU484240.1)	100
	qb	<i>Mucor indicus</i> (AY054699.1)	99
	清B	<i>Amylomyces rouxii</i> (AB250171.1)	99

刻的乳酸菌和曲/醅中含量极少的醋酸菌。鉴定出的酵母和霉菌种属与清香型大曲白酒相似。

2.4 清香型小曲白酒中主要微生物的功能分析

对于清香型小曲白酒生产体系中检测出的微生物,结合资料查阅和实验室研究分析,初步了解其功能特性。

Bacillus 是普遍存在的细菌,具有水解淀粉和蛋白质的能力,与大曲白酒中一些风味物质(如吡嗪类化合物)的形成有关^[7]。但实验室混菌发酵试验结果表明,其对小曲白酒风味特征影响很小。

生产体系中优势的酵母有4种: *Sa. cerevisiae*、*Sp.*

fibuligera、*I. orientalis* 和 *P. anomala*。*Sa. cerevisiae* 可将葡萄糖在无氧条件下发酵成为酒精和二氧化碳,是主要的产酒酵母;后3种是白酒中常见的产酯酵母,合成白酒中主要的酯类风味物质;*Sp. fibuligera* 广泛存在于白酒大曲中,淀粉分解能力强,在有氧条件下具有一定的酯化能力^[8]。但实际发酵过程是个微氧或无氧状态,故其产酯能力较弱,其在白酒发酵过程中其他的功能有待后续的研究;*P. anomala* 也广泛存在于白酒的大曲中,其在白酒发酵过程中所起的作用主要是在微氧或无氧条件下形成酯类呈香物质^[9]。该菌能耐低 pH 值、低水活度、高渗透压、厌氧等极端环境,在限氧条件下能够激活发酵途径中的关键酶而进行酒精发酵,而且对葡萄糖的吸收率和乙醇、甘油、乙酸乙酯等代谢物含量都有所增加^[10];*I. orientalis* 在有氧和限氧条件下也具有较高的产酯活性。

土曲和酒醅中主要霉菌有5种,即 *R. oryzae*、*Ab. corymbifera*、*M. indicus*、*As. clavatus* 和 *Am. rouxii*。*As. clavatus* (棒曲霉)曾被认为是清香型小曲白酒中的功能霉菌,然而更加深入的研究表明,*R. oryzae* 才是对酿酒起重要作用的霉菌。*R. oryzae* 能够合成一系列的胞外和胞内酶,如纤维素酶、果胶酶、单宁酸酶、淀粉酶、脂肪酶、蛋白酶等。因此该菌具有较高的糖化力和蛋白水解力,主要起糖化作用。另外,*R. oryzae* 还能产生一系列代谢产物,如酶类、酯类、有机酸、对白酒风味也有贡献作用^[11],所以在白酒固态发酵中 *R. oryzae* 起着非常重要的作用。*Amylomyces* 属中仅有 *Am.rouxii* 1个菌种,其形态与 *R. oryzae* 很相近,但利用蔗糖产生乳酸的能力强于 *R. oryzae*^[12]。*Am.rouxii* 是亚洲酿造型米酒中主要的霉菌,能降解淀粉生成葡萄糖,并产生淀粉葡萄糖苷酶。*Mucor indicus* 是常用的腐乳生产菌种,也被用于生产蛋白酶、糖化酶、 α -淀粉酶、脂肪酶、果胶酶、凝乳酶等,并具有较强的代谢五碳糖和六碳糖产生乙醇的能力。在白酒酿造中,*Absidia* 被认为是污染菌,会导致白酒产生霉苦味。

3 结论

采用未培养方法和培养技术分析清香型小曲种曲、土曲和发酵酒醅,明确了白酒生产体系中微生物组成,并分析其对小曲酒生产的贡献。

由于制曲过程中强化了 *S. cerevisiae* 和 *R. oryzae*,对其他的酵母和霉菌产生竞争性抑制作用,竞争生长所需的营养物质和生存空间。发酵过程中,其他酵母和霉菌的

数量迅速下降,使得从发酵中期开始,*S. cerevisiae* 和 *R. oryzae* 成为绝对优势的真菌。

小曲和酒醅中细菌以乳酸菌和芽孢杆菌为主,其对小曲白酒风味特征影响很小;酵母中,*S. cerevisiae* 的作用是酒精发酵产生乙醇,*Sp. fibuligera*、*P. anomala* 和 *I. orientalis* 是产酯酵母,增加酒体酯香味;霉菌中 *R. oryzae* 是糖化菌。

参考文献:

- [1] Ercolini D. PCR-DGGE fingerprinting: novel strategies for detection of microbes in food[J]. Journal of Microbiological Methods, 2004, 56:297-314.
- [2] 杨强,王衍,董国强. 清香型小曲酒的香味组分特点及风味特征[J]. 酿酒科技, 2001(2):75-76.
- [3] Wang H Y, Gao Y B, Fan Q W, et al. Characterization and comparison of microbial community of different typical Chinese liquor Daqus by PCR-DGGE[J]. Letters of Applied Microbiology, 2011, 53: 134-140.
- [4] 徐成勇,郭波,周莲,等. 酿酒小曲研究进展[J]. 食品与发酵工业, 2001, 25(3): 1-6.
- [5] 王元太. 清香型白酒酿造技术[M]. 北京:中国轻工业出版社, 2009.
- [6] 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.
- [7] 张荣,徐岩,范文来,等. 酱香大曲中地衣芽孢杆菌及其特征风味代谢产物的分析研究[J]. 工业微生物, 2010, 40(3): 7-14.
- [8] Machida M, Ohtsuki I, Fuku S, et al. Nucleotide sequences of *Saccharomyces fibuligera* genes for extracellular beta-glucosidases as expressed in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1988, 54(12): 3147-3155.
- [9] 刘源才,郭圣祥,李锐利,等. 高产乙酸乙酯酵母的产酯条件[J]. 食品与发酵科技, 2011, 47(2): 22-24.
- [10] Fredlund E, Blank L M, Schnü rer J., et al., Oxygen- and glucose-dependent regulation of central carbon metabolism in *Pichia anomala*[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2004, 70(10): 5905-5911.
- [11] 田国政. 酒曲根霉糖化性质的研究[J]. 湖北民族学院学报:自然科学版, 2003, 21(2): 19-21.
- [12] Watanabe T, Oda Y Oda. Comparison of sucrose-hydrolyzing enzymes produced by *Rhizopus oryzae* and *Amylomyces rouxii* [J]. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 2008, 72 (12): 3167-3173.

2012年前10个月中国啤酒行业产量4319.3万千升

本刊讯 2012年前10个月,中国啤酒行业累计产量4319.3万千升,同比增长3.8%。山东、河南和广东前10个月产量排名全国前三名,产量均超过400万千升。宁夏、青海和海南前10个月产量排名全国最后三名,产量均低于15万千升。(小小荐)

来源 华夏酒报·中国酒业新闻网 中国国际啤酒网 2012-11-19