

文章编号:1673-1689(2011)05-0745-05

制麦过程中微生物菌群的变化

苏红旭¹, 王璐², 徐凯³, 邱然³, 赵长新¹, 江国金^{*3}

(1. 大连工业大学 生物工程学院, 辽宁 大连 116034; 2. 国家粮食储备局 无锡科学研究设计院, 江苏 无锡 214035; 3. 中粮麦芽(大连)有限公司, 辽宁 大连 116200)

摘要: 通过培养计数法研究制麦过程中微生物菌群的数量变化。结果表明:大麦表面及内部微生物数量和大麦品种有关,制麦过程中的微生物主要来自大麦表面;浸麦激活污染微生物生长,发芽后期其数量达到最大值,干燥后污染微生物急剧下降;两次浸麦阶段有不同微生物菌群分布;分离及鉴定10种制麦过程中主要真菌;适当的物理和化学方法可以减少微生物数量,而又不影响发芽率。

关键词: 大麦;制麦;微生物菌群;真菌

中图分类号: TS 261.2

文献标识码: A

Preliminary Study on Variation of Microbial Community in Malting

SU Hong-xu¹, WANG Lu², XU Kai³, QIU Ran³,
ZHAO Chang-xin¹, JIANG Guo-jin^{*3}

(1. School of Biological Engineering, Dalian Polytechnic University, Dalian 116034, China; 2. Wuxi Scientific Research and Designing Institute of the State Administration of Grain, Wuxi 214035, China; 3. COFCO Malt(Dalian) Co. Ltd, Dalian 116200, China)

Abstract: Dynamic changes of microbial community in malting were studied in this manuscript by the method of counting medium. Experimental results are showed as follow, the quantity of microorganism correlated with variety of barley on the surface of barley and internal. Microorganism was from external surfaces of barley in malting. Steeping of barley rapidly activated the dormant microbes present in barley. The amount of microorganism increased to its maximum on the later stage of the germination, and decreased to certain level after kilning. There were different kinds of microbial community in the steeping. The 10 main fungi strains in malting were separated and identified. Appropriate physical and chemical methods were efficiently decreased the quantity of microorganism, but has no effect on the germination rate.

Key words: barley, malting, microbial community, fungus

啤酒是人类所知的最古老的饮料之一。麦芽 是啤酒酿造的主要原料,麦芽品质的好坏直接影响

收稿日期:2010-10-19

基金项目:国家“十一五”科技支撑计划项目(No. 2007BAK36B01)。

* 通信作者:江国金(1967—),男,安徽绩溪人,高层管理人员工商管理硕士,高级工程师,硕士研究生导师,主要从事制麦技术方面的研究。Email:qiuran@cofco.com

着啤酒质量好坏。制麦过程实际上是麦芽溶解的过程,麦芽溶解的好坏不仅与大麦本身的特性及制麦工艺有关,还与大麦所携带的微生物的种类和数量有关^[1]。大麦上的微生物菌群对大麦生长、麦芽质量及其啤酒酿造过程都有着很大的影响。附着在大麦表面的微生物(细菌、丝状真菌和酵母等)种类繁多,数量庞大^[1-4],这与生长环境、贮存条件和生产加工过程密切相关。大麦表面微生物的繁殖除发生在田间和贮存时,也发生在制麦和麦芽贮藏期间^[5-7]。制麦条件如温度、湿度和通风等也对大麦微生物群的生长有较大的影响。制麦过程中这些微生物有着非常复杂的相互作用,制得的成品麦芽上也会有大量的微生物存在。微生物污染的大麦或麦芽对啤酒会造成危害,影响啤酒的质量及口味,对食品安全也有一定影响。作者研究制麦过程中的微生物种类与数量的动态变化,并对制麦过程中的真菌进行鉴定。

1 材料与方法

1.1 实验材料

内蒙大麦:中粮麦芽(大连)有限公司。

1.2 培养基

好氧细菌计数培养基(营养琼脂培养基):蛋白胨 10 g,牛肉膏 3 g,NaCl 5 g,琼脂 15~20 g,冷却至 40 ℃,蒸馏水 1 000 mL,pH 7.2~7.4。

霉菌及酵母计数培养基(PDA 培养基):马铃薯 20 g,葡萄糖 20 g,琼脂 15~20 g,氯霉素 0.1 g,蒸馏水 1 000 mL,pH 值自然。

1.3 仪器设备

SPX-150B 微生物生化培养箱:上海悦丰仪器仪表有限公司;HY-5 回旋振荡器:国华企业;PTC-100 型 PCR 扩增仪:美国 MJ. Research. 公司;DY-501 型电泳仪:上海万达科技器材服务部;凝胶成像仪:IVA(中国)公司。

1.4 实验方法

1.4.1 制麦流程 原料大麦(除杂,精选,分级后),第一次湿浸(锥底 6 h),第一次干浸(16 h),第二次湿浸(平底 5 h),第二次干浸(3 h),发芽 4 d(96 h),干燥(25 h)后成品麦芽。

1.4.2 微生物的检测 称取大麦样品 20 g,在无菌操作台中倒入盛有 180 mL 无菌水的三角瓶中,塞紧棉塞,回旋振荡器上 200 r/min 振荡 15 min。以 10 倍稀释法依次稀释(浸麦水中微生物检测直接稀释),选取适合浓度,用无菌移液管吸取 0.2 mL 分别涂布于上述培养基平皿上(每个稀释度做 3

个平行),好氧细菌 35 ℃培养 2 d,霉菌 28 ℃培养 4 d,酵母菌 28 ℃培养 4 d,数平皿的菌落数。

1.4.3 大麦内部微生物的检测 称取大麦 20 g,用 20 mL 有效氯 10% 的次氯酸钠浸泡 10 min,无菌水清洗后用无菌的研钵捣碎,进行微生物检测。

1.4.4 物理和化学处理方法(热处理和漂液处理)

称取 3 份大麦各 300 g,其中两份大麦用去离子水清洗一次,一份用 60 ℃热水处理 100 s。分别加入 500 mL 去离子水进行浸麦,向其中一份未经热处理的大麦中加入漂液(有效氯 10%)1 g,第一次浸麦结束后进行微生物测定,并在发芽 3 d 后测定发芽率。

1.4.5 真菌 DNA 的提取、PCR 扩增和 PCR 产物纯化及克隆 分离大麦表面污染真菌,进行 DNA 提取、PCR 扩增和 PCR 产物纯化及克隆,方法见文献[8-9]。

1.4.6 测序 样品由江南大学食品科学与技术国家重点实验室进行序列测定。

1.4.7 序列对比 测序结果经 DNAMAN 软件去除载体后,将所得的 ITS rDNA 序列提交到 GenBank 数据库,利用 Blastn 工具进行序列比对,对优势霉菌进行鉴定。

2 结果与讨论

2.1 不同种大麦表面和内部污染微生物情况

大麦表面及其内部的微生物主要来自于田间和贮藏环境,包括细菌、霉菌和酵母。对 11 种不同产地的大麦表面及内部好氧细菌、酵母菌和霉菌进行分析,见表 1、2。

表 1 不同品种大麦表面上的微生物数量

Tab. 1 Microorganisms in the different varieties of barley on the surfaces cfu/g 绝干大麦

大麦表面		细菌	酵母菌	霉菌
法麦	Azurel	1.1×10^5	5.7×10^2	8.5×10^1
	Sabastian	3.0×10^6	2.9×10^2	1.5×10^2
	Henley	4.6×10^5	2.3×10^2	5.7×10^1
澳麦	Gairdner	3.4×10^5	2.4×10^3	4.5×10^2
	Baudin	9.8×10^6	2.2×10^3	6.6×10^2
	Hamlin	1.3×10^6	4.7×10^4	1.8×10^2
	Schooner	1.1×10^5	3.7×10^3	1.7×10^3
	Vlamingh	7.9×10^5	1.7×10^4	8.8×10^2
加麦	Metcalfe	2.2×10^6	2.5×10^3	5.7×10^2
国产麦	内蒙大麦	8.5×10^7	2.9×10^4	1.6×10^4
	苏北大麦	3.7×10^7	8.3×10^3	5.7×10^3

表 2 不同品种大麦内部的微生物数量
Tab. 2 Microorganisms in the different varieties of barley internally

		cfu/g 绝干大麦		
大麦内部		细菌	酵母菌	霉菌
法麦	Azurel	1.3×10^4	4.6×10^1	0
	Sabastian	7.8×10^3	3.4×10^1	1.1×10^1
	Henley	1.7×10^2	1.5×10^1	0
澳麦	Gairdner	1.4×10^5	1.1×10^1	0
	Baudin	2.7×10^4	9.1×10^1	0
	Hamlin	3.5×10^3	3.0×10^2	0
	Schooner	6.7×10^3	2.0×10^2	3.3×10^1
	Vlamingh	2.3×10^2	1.1×10^1	0
加麦	Metcalfe	2.9×10^4	1.1×10^1	0
国产麦	内蒙大麦	8.8×10^4	2.2×10^3	5.9×10^1
	苏北大麦	1.1×10^5	1.4×10^3	2.3×10^1

在大麦表面,好氧细菌数量在 $1.1\times10^5\sim8.5\times10^7$ cfu/g 绝干大麦之间,酵母菌数量在 $2.3\times10^2\sim4.7\times10^4$ cfu/g 绝干大麦之间,霉菌数量在 $5.7\times10^1\sim1.6\times10^4$ cfu/g 绝干大麦之间。在大麦内部,好氧细菌数量在 $1.7\times10^2\sim1.1\times10^5$ cfu/g 绝干大麦之间,酵母菌数量在 $1.1\times10^1\sim2.2\times10^3$ cfu/g 绝干大麦之间,霉菌数量在 $0\sim5.9\times10^1$ cfu/g 绝干大麦之间。大麦污染的好氧细菌>酵母菌>霉菌。大麦表面及内部污染微生物的数量和大麦种类有关,国产的内蒙大麦和苏北大麦明显高于进口的法麦、澳麦和加麦,微生物数量高出 10~1000 倍之间。大麦表面的污染微生物数量明显高于大麦内部的污染微生物的数量,微生物数量高出 100~1000 倍之间。所以说制麦过程中的污染微生物主要来自于田间和贮藏过程中大麦表面所携带的微生物。

2.2 制麦过程中微生物情况

制麦过程是大麦发芽的过程,同时也是大麦污染微生物生长的过程,大麦表面及内部的微生物在适合的条件下迅速生长繁殖,微生物生长阶段主要发生在浸麦和发芽阶段,情况见表 3。

由表 3 可知,大麦浸水时激活了休眠的微生物:霉菌孢子发芽、菌丝体生长,酵母菌和细菌繁殖。在浸麦过程中好氧细菌数量增长 1.6~100 倍,霉菌数量增长 3.9~20 倍,酵母菌数量增长 2.4~11.9 倍。制麦采用 30 h 浸麦,两浸两断,湿浸虽然激活了休眠的微生物,溶出物质给微生物提供营养,但也洗去大麦表面的大部分微生物,再加上杀

菌剂的加入,两次湿浸的微生物数量分别下降到前一阶段 1/50~1/400,由于干浸阶段比湿浸阶段氧气充足,一部分营养物质沉积在大麦表面,微生物迅速生长,所以第二次湿浸的大麦表面微生物比第一次湿浸的要多,在浸麦结束后大麦表面的微生物数量比原料大麦表面上的微生物数量有所增加。

表 3 商业制麦过程中大麦(麦芽)上微生物数量
Tab. 3 Microorganisms in the commercial malting of barley or malt

阶段	好氧细菌	霉菌	酵母菌
原料大麦	5.4×10^7	1.4×10^3	7.5×10^4
第一次湿浸大麦	1.3×10^5	1.7×10^2	5.2×10^3
第一次干浸大麦	5.1×10^9	2.9×10^4	8.9×10^5
第二次湿浸大麦	8.7×10^7	5.4×10^3	1.8×10^5
第二次干浸大麦	1.1×10^8	1.1×10^4	8.6×10^5
发芽第一天绿麦芽	9.9×10^7	8.8×10^4	4.6×10^5
发芽第二天绿麦芽	1.1×10^9	8.7×10^5	2.1×10^7
发芽第三天绿麦芽	1.9×10^9	8.8×10^4	2.3×10^6
发芽第四天绿麦芽	5.4×10^{11}	8.8×10^4	1.3×10^7
成品麦芽	3.2×10^9	3.2×10^4	7.3×10^5

大麦发芽阶段,绿麦芽上的微生物数量总要高于原料大麦。和原料大麦相比,绿麦芽上的好氧细菌增长 1000 倍,在发芽第四天达到峰值 5.4×10^{11} cfu/g 绝干麦芽。发芽阶段的霉菌和酵母菌数量与原来大麦相比增加 6~280 倍,在发芽第二天达到最大值,之后霉菌和酵母菌有小幅下降。发芽期间随着绿麦芽胚乳的溶解为微生物提供丰富的养分,发芽箱的温度、湿度和氧浓度为微生物提供了有利的生长条件,细菌和酵母菌大量生长,霉菌菌丝体蔓延到其它谷粒上。绿麦芽上微生物种群间比较复杂的竞争关系,可能是霉菌和酵母菌在发芽第二天后数量下降的原因。

绿麦芽经干燥后制成成品麦芽,干燥杀灭绝大多数微生物,和发芽期间相比,微生物数量明显下降。但成品麦芽上的微生物数量比经除杂、精选、分级后的大麦表面上的多。这可能是由于干燥后的麦芽在除根和运输过程中又受到微生物的侵染。

2.3 浸麦水中微生物情况

浸麦过程激活了微生物,同时浸麦水也带走大量微生物,减少微生物对大麦发芽的影响。浸麦水中的微生物情况也间接反映大麦表面上微生物的情况,结果见表 4 和图 1。

由表 4 可知,两次浸麦结束时浸麦水中均含有大量的微生物,第二次浸麦水中的好氧细菌、霉菌和酵母菌总量分别是第一次浸麦水的 100 倍、9 倍和 20 倍,说明第一次干浸时微生物迅速增长,这也验证了 2.2 的结论。

表 4 商业制麦过程中浸麦水的微生物数量

Tab. 4 Microorganisms in the commercial malting of steeping water

阶段	好氧细菌	霉菌	酵母菌
工业自来水	8.2×10^1	0	0
第一次浸麦水	2.1×10^6	1.0×10^3	7.0×10^3
第二次浸麦水	1.3×10^8	9.0×10^3	1.5×10^5

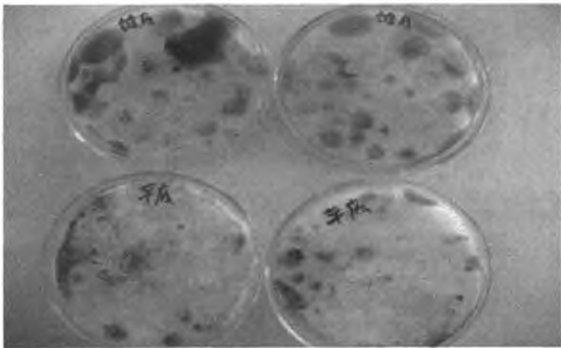


图 1 第一次浸麦水(锥底)和第二次浸麦水(平底)中菌落分布

Fig. 1 Colony distribution in the cylindric-conical bottom steeping and flat bottom steeping water

由图 1 可以看出,两次浸麦水中的优势霉菌菌群不同,第一次浸麦水中主要污染菌为菌落呈黑色的霉菌,第二次浸麦水中主要污染菌为菌落呈红色的霉菌,这是由于一些霉菌在大麦内部,第一次湿浸水中的霉菌为大麦表面污染菌,而由于干浸时氧气比较充足,大麦内部的霉菌快速生长到大麦表面,导致第二次浸麦水中的霉菌主要为大麦内部污染菌。

2.4 主要真菌的分离和鉴定

对大麦表面污染微生物采用真菌分离培养基进行稀释分离,共从平板中分离出 9 株真菌,分别记为 A~I。

经 ITS rDNA 测序,把所得的 ITS rDNA 序列提交到 GenBank 数据库,利用 Blastn 工具进行序列对比,对制麦过程中主要真菌进行鉴定,见表 5。

由表 5 可知,经鉴定在制麦过程中主要真菌为 A 菌为 *Alternaria tenuissima* (极细链格孢霉),B 菌为 *Penicillium oxalicum* (草酸青霉),C 菌为 *Fusarium ciliatum* (*ciliatum* 镰孢霉),D 菌为 *Rhizopus oryzae* (米根霉),E 菌为 *Rhodotorula slooffiae*

(*slooffiae* 红酵母),F 菌为 *Trichosporon jirovecii* (耶氏丝孢酵母),G 菌为 *Fusarium* sp. (镰孢霉),H 菌为 *Galactomyces geotrichum* (*Galactomyces* 白地霉),I 菌为 *Alternaria* sp. (链格孢霉)。

有文献报道,制麦过程中对麦芽品质影响的微生物主要是真菌,如镰孢霉能够产生并分泌疏水蛋白而引起啤酒的喷涌^[10],根霉能够增加麦汁的色度和浊度等^[11],因此对制麦过程中微生物数量的控制显得十分重要。

表 5 10 株真菌的 ITS 序列与 GenBank 最相似序列的比对结果

Tab. 5 The consequence of the sequence contrast identification with traditional culture-dependent method

菌株	ITS 片段长度/bp	序列相似度/%	比对结果
A	542	99%	<i>Alternaria tenuissima</i>
B	590	99%	<i>Penicillium oxalicum</i>
C	528	95%	<i>Fusarium ciliatum</i>
D	594	99%	<i>Rhizopus oryzae</i>
E	562	100%	<i>Rhodotorula slooffiae</i>
F	502	98%	<i>Trichosporon jirovecii</i>
G	506	99%	<i>Fusarium</i> sp.
H	689	99%	<i>Galactomyces geotrichum</i>
I	570	99%	<i>Alternaria</i> sp.

2.5 物理方法和化学方法对大麦表面微生物的影响

大麦污染微生物现今已受到高度的重视,防止或抑制大麦表面微生物繁殖的方法主要有物理方法、化学方法和生物方法,工业制麦生产上主要采用前两种方法。物理方法和化学方法对大麦表面微生物数量的影响见表 6。

表 6 物理方法和化学方法处理后大麦表面上微生物数量

Tab. 6 Microorganisms on the surfaces of barley after physical and chemical method

处理方法	好氧细菌	霉菌	酵母菌	发芽率/%
热处理	6.7×10^7	1.6×10^3	2.8×10^3	62
漂液处理	5.6×10^7	1.9×10^3	4.2×10^3	63
对照	2.8×10^8	8.1×10^3	1.1×10^4	65

由表 6 可知,经热处理和漂液处理,在第一次湿浸结束后大麦表面上的微生物数量和对照相比均有所下降,而发芽率相差不多。说明对大麦进行适当的处理可以减少大麦表面微生物对麦芽的影响,而又不影响大麦的发芽。

3 结 语

1) 大麦污染的好氧细菌>酵母菌>霉菌。污染微生物的数量与大麦种类有关,大麦表面污染微生物数量明显高于大麦内部,制麦过程中的污染微生物主要来自于大麦表面所携带的微生物。

2) 浸麦激活污染微生物的生长,大麦表面污染微生物数量浸麦结束后高于原料大麦,在发芽阶段达到峰值,干燥后急剧下降。

3) 第一次干浸时微生物生长较快,在两次浸麦阶段有不同的霉菌菌群分布。

4) 制麦过程中主要真菌为 A 菌为 *Alternaria tenuissima*, B 菌为 *Penicillium oxalicum*, C 菌为 *Fusarium ciliatum*, D 菌为 *Rhizopus oryzae*, E 菌为 *Rhodotorula slooffiae*, F 菌为 *Trichosporon jirovecii* (耶氏丝孢酵母), G 菌为 *Fusarium sp.*, H 菌为 *Galactomyces geotrichum*, J 菌为 *Alternaria sp.*, K 菌为 *Alternaria*。

5) 在浸麦阶段利用适当的物理和化学方法对大麦进行处理可以有效减少微生物的数量,而又不影响发芽率。

参考文献(References):

- [1] Van Nierop S N E, Rautenbach M. The impact of microorganisms on barley and malt quality-A review[J]. *American Society of Brewing Chemists*, 2006(64): 69-78.
- [2] Booyens C, Disk L M, Meijering I, et al. Isolation, identification and changes in the composition of lactic acid bacteria during the malting of two different barley cultivars[J]. *Int J Food Microbiol*, 2002, 76: 63-73.
- [3] Hudec K. Influence of harvest date and geographical location on kernel symptoms, fungal infestation and embryo viability of malting barley[J]. *Int J Food Microbiol*, 2007, 113(2): 125-132.
- [4] Laitila A, Kotaviita E, Peltola P, et al. Indigenous microbial community of barley greatly influences grain germination and malt quality[J]. *J Inst Brew*, 2007, 113(1): 9-20.
- [5] Vaughan V, O'Sullivan T, van Sinderen D. Enhancing the microbiological stability of malt and beer-A review[J]. *J Inst Brew*, 2005, 111(4): 355-371.
- [6] Gales P W. A Comparison of visual turbidity with turbidity measured by commercially available instruments[J]. *J Am Soc Brew Chem*, 2000, 58(3): 101-107.
- [7] Noots I, Delcour J A, Michiels C W. From field barley to malt: detection and specification of microbial activity for quality aspects[J]. *J Criti Rev Microbio*, 1999, 25(2): 121-53.
- [8] 曹钰, 陆建, 方华, 等. 绍兴黄酒麦曲中真菌多样性的研究[J]. *食品科学*, 2008, 29(3): 277-282.
CAO Yu, LU Jian, FANG Hua, et al. Fungal diversity of wheat Qu of Shaoxing rice wine[J]. *Food Science*, 2008, 29(3): 277-282. (in Chinese)
- [9] 陆建, 曹钰, 方华, 等. 绍兴黄酒麦曲中真菌的初步研究[J]. *食品与生物技术学报*, 2008, 27(2): 78-83.
LU Jian, CAO Yu, FANG Hua, et al. Fungal community of wheat Qu of Shaoxing rice wine[J]. *Journal of Food Science and Biotechnology*, 2008, 27(2): 78-83. (in Chinese)
- [10] Sarlin T, Vilpolal A, Kotaviita E, et al. Fungal hydrophobins in the barley-to-beer chain[J]. *J Inst Brew*, 2007, 113(2): 147-153.
- [11] 龙杰, 孙军勇, 陆建, 等. 微生物对麦芽品质的影响[J]. *啤酒科技*, 2007, 01: 13-16.
LONG Jie, SUN Junyong, LU Jian, et al. Impact of microorganisms on malt quality[J]. *Beer Science and Technology*, 2007, 01: 13-16. (in Chinese)