

糟醅堆积过程中微生物种群的变化规律

山其木格, 梁慧珍*, 张长霞, 张林奇, 谭旭, 梁丽泉, 李长文

(天津市天士力控股集团 保健食品研究所, 天津 300402)

摘要: 糟醅堆积发酵是酱香型白酒生产工艺中一个重要的环节, 对白酒品质、产量有很大的影响。采用 PCR-DGGE 生物技术研究酱香型白酒酿造中所有的糟醅堆积过程, 对堆积糟醅中的微生物种群变化进行跟踪, 揭示微生物种群在各个轮次糟醅堆积过程的变换规律。从整体看, 堆积发酵过程细菌种类多于真菌种类, 下沙期间堆积糟醅的微生物种类很少, 糙沙阶段微生物种类开始逐渐增多, 二轮次堆积时微生物种类最丰富, 且在整个酿酒年度的末期, 堆积糟醅微生物多样性有减少现象。

关键词: 堆积发酵; 微生物种群变化; 糟醅

中图分类号: Q 815 文献标志码: A 文章编号: 1673—1689(2016)03—0330—06

Changes of Microbial Diversity in Stacked Fermentation for the Production of Moutai Flavor Liquor

SHAN Qimuge, LIANG Huizhen*, ZHANG Changxia, ZHANG Linqi,
TAN Xu, LIANG Liqun, LI Changwen

(Tianjin Tasly Holding Group Division of Nutraceutical Products, Tianjin 300402, China)

Abstract: Stacked fermentation is an important part in the production of Moutai flavor liquor and has a great impact on the yield and quality of liquor. The study used PCR-DGGE to reveal the change of microbial population in eight rounds of stacked fermentation during the production of Moutai flavor liquor. It was concluded that there was a certain rule in the change of microbial diversity: the bacterial species in stacked fermentation were more than fungal species during all rounds of stacked fermentation; for the first round, there were only a few microbial species; in the second round, the microbial diversity began to increase; when the fermentation came to the fourth round, the microbial diversity was most abundant; in the final round, the microbial diversity tended to decrease.

Keywords: stacked fermentation, changes of microbial diversity, fermented grains

酱香型白酒是我国主要的白酒香型之一, 属大曲酒类。典型的酱香白酒特点为酱香突出、幽雅细腻、酒体醇厚、回味悠长、空杯留香持久。酱香型白酒的生产以一年为一个生产周期, 经过 2 次投料, 9 次蒸煮, 8 轮发酵, 7 次取酒。酱香型白酒“四高两

长”的生产工艺是其品质风格特点的源泉, 其中之一即高温堆积, 某种程度上可说没有堆积就没有酱香酒^[1-2]。

在酱香白酒生产中, 由于采用的是高温制曲, 导致在大曲制作过程中几乎所有的酵母菌都被杀

收稿日期: 2014-12-12

作者简介: 山其木格(1979—), 女, 新疆乌鲁木齐人, 蒙古族, 工学硕士, 工程师, 主要从事微生物发酵研究。E-mail: sqmg790309@163.com

* 通信作者: 梁慧珍(1968—), 女, 山东烟台人, 工学硕士, 高级工程师, 主要从事微生物发酵研究。E-mail: misslianghuizhen@sina.com

死。经过后来的堆积过程,糟醅网罗空气中微生物尤其是酵母菌。堆积也是微生物发酵产生各种酶类,并在多种微生物及其酶类共同作用下生成酒体中的香味物质及其前体物质的过程。因此堆积也称为“二次制曲”。在堆积过程中温度由内向外不断升高,最终堆积糟醅顶温升至 50 ℃ 左右,糟醅表面产生一层白色斑点,并产生明显的酒香味,略有酱香时即可入池发酵。此外,经过高温堆积也抑制或淘汰了一部分杂菌,驯化了耐高温酵母,更有利于耐高温细菌的繁殖与作用,有利于糖化发酵,促进酱香风味的形成,为窖内发酵创造了条件^[3]。可见,堆积发酵对出酒率和产酒品质都有很大的影响。从图 1 的酱香型白酒工艺流程可以看出,在整个酿酒年度中有 8 次糟醅堆积过程,分别在下沙、糙沙、一轮次、二轮次、三轮次、四轮次、五轮次及六轮次期间进行,待七轮次酒蒸馏之后丢糟。酱香白酒酿造过程中,各轮次堆积时的气候、温湿度及原料状态等条件不同,各个轮次基酒的特点也各不相同,因此针对各轮次堆积过程的菌种多样性进行分析具有重要的意义。

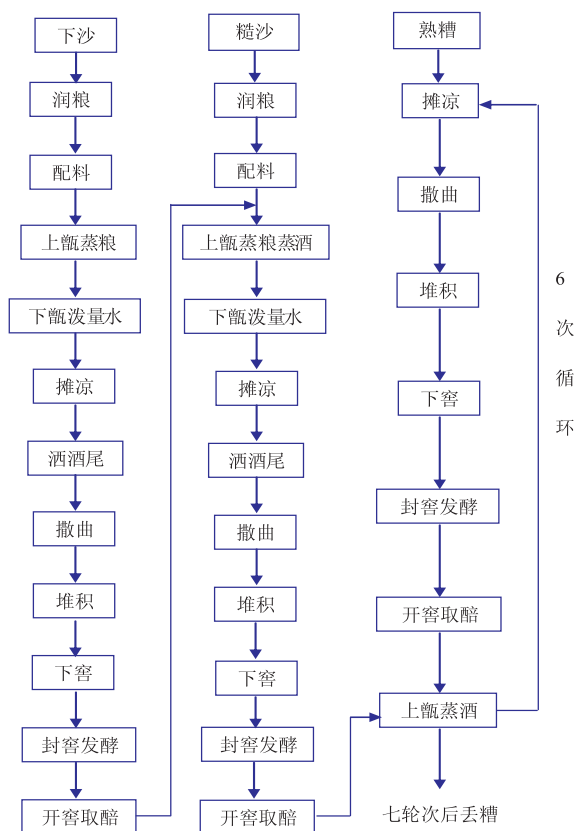


图 1 酱香型白酒工艺流程

Fig. 1 Moutai-flavor liquor production process

近 10 年来,关于酱香型白酒微生物的研究一直未曾间断,主要集中于从酒曲、糟醅、窖泥中分离特殊功能微生物,并研究其生理生化特性及对白酒品质的改良功能。这些研究主要以传统微生物实验技术、采用划线分离及形态鉴定,采用分子生物学鉴定的报道较为少见^[4]。黄永光等人在“酱香白酒堆积发酵过程酒醅中的酵母菌的分析研究”一文中对堆积发酵过程酒醅中的酵母菌进行分离、形态学初筛和 PCR 产物扩增及 26S rDNA 定性鉴定分析,并对其中所获取的部分优选菌株的发酵性能及其发酵代谢风味成分贡献进行了研究^[5]。利用 PCR-DGGE 技术研究糟醅堆积过程中的微生物多样性,克服了常规平板培养方法的一些缺点,在分析复杂微生物生态演替规律的研究中具有较大的应用价值。

本课题研究中主要采用 PCR-DGGE 生物技术,针对酱香型白酒酿造中所有的糟醅堆积过程,对堆积糟醅中的微生物种群变化进行跟踪,从而揭示微生物种群在各个轮次糟醅堆积过程的变换规律。

1 材料与方法

1.1 样品

糟醅样品取自贵州国台酒业有限公司酿酒车间。首先对堆积糟醅各个部位进行温度测量,挑选出温度上升较明显、微生物活动较活跃的位点,即 100 cm 高 40 cm 深处作为取样检测的固定位点,并在糟醅堆积的各个阶段进行取样分析。

1.2 试剂和仪器

TaqDNA 聚合酶、dNTP, 购自 TaKaRa 公司;土壤总 DNA 提取试剂盒,购自 OMEGA 公司;PCR 仪 MyCycler™ Thermal Cycler, DGGE 图谱 DCode™ 通用突变检测系统,Discovery Series 凝胶成像系统,Quantity One 分析软件,均购自美国 Bio-Rad 公司;DYY-6C 琼脂糖电泳装置,购自北京六一仪器厂。

1.3 实验方法

1.3.1 总 DNA 的提取 糟醅样品取样后,冷冻密封保存于冰箱 -20 ℃,尽快提取样品总 DNA。将糟醅样品加入 PBS 缓冲液 (pH 7.4) 中,摇床振荡,逐步离心,收集菌体。使用土壤总 DNA 提取试剂盒,根据说明书的指示,进行各轮次堆积糟醅样品中微生物总 DNA 的提取。

1.3.2 PCR 扩增 以糟醅样品总 DNA 为模板,利

用巢式 PCR 技术,扩增出 16S rDNA V3 可变区,供糟醅样品细菌群落分析^[6]。应用通用引物 16S1 (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3') 和 16S2 (5'-TACGGYTACCTTGTACGACTT-3'),进行第一步扩增,得到 16S PCR 产物;再以 16S PCR 产物为模板,利用第二步扩增引物 R518 (5'-ATTACCGCGGCTGCTGG-3') 和 338F (5'-ACTCCTACGGGAGGCAGCAG-3'),扩增得到细菌 16S rDNA V3 可变区片段。与此同时,以糟醅总 DNA 为模板,利用巢式 PCR 技术,扩增出真菌 FR1/FF390 区,供糟醅样品真菌群落分析。应用通用引物 Geo11 (5'-ACCTTGTACGACTTTTACTTCC-3') 和 GeoA2 (5'-CCAGTAGTCATATGCTTGTCTC-3') 进行第一步扩增,得到 18S PCR 产物;再以 18S PCR 产物为模板,利用第二步扩增引物 FR1 (5'-AICCATTCATCGGTAIT-3') 和 FF390 (5'-CGATAAC GAACGAGACT-3') 扩增得到真菌 FR1/FF390 区。在引物 338F 和 FR1 中分别引入 GC 发夹,以便在 DGGE 中有效分离。PCR 反应条件为:94 ℃,4 min;94 ℃变性 30 s,50~55 ℃退火 30 s;72 ℃延伸 60 s,30 个循环;72 ℃,10 min。用 1 g/dL 琼脂糖凝胶电泳对 PCR 产物进行检测。

1.3.3 变性梯度凝胶电泳及图像分析 堆积糟醅样品的细菌 16S rDNA V3 可变区和真菌 FR1/FF390 区通过 DGGE 分析研究微生物群落的构成^[7]。根据经验,对细菌和真菌分析采用不同浓度、不同梯度的 DGGE 方法。对于细菌 16S rDNA V3 可变区,丙烯酰胺凝胶浓度为 10 g/dL,变性梯度范围为 30%~60% (100% 变性梯度包含体积分数 40% 甲酰胺和 7 mol/L 尿素);对于真菌 FR1/FF390 区,丙烯酰胺凝胶浓度为 8 g/dL,变性梯度范围为 20%~50%。PCR 产物电泳上样量均为 50 μL,电泳采用 DCode™ 通用突变检测系统。首先在 20 V 电压预电泳 20 min,随后调整至 100 V,电泳 10 h。电泳结束后,进行 SYBR Green I 染色液染色,通过紫外凝胶成像仪捕获图像。利用分析软件 Quantity One,读取图谱上条带的光密度值,完成匹配比对后,采用 UPGAMA 算法进行聚类分析,并生成 DGGE 图谱相似性分析图^[8]。

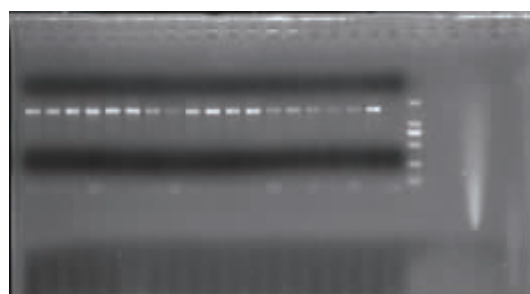
1.3.4 序列分析 DGGE 结束后,对其主要优势条带进行切胶回收。用 R518/338F 和 FR1/FF390 引物分别进行再扩增后纯化,参考 pUCm-T 载体说明书

进行转化、克隆。挑取阳性克隆子交由 BGI 公司进行序列测定。将所测得的序列在美国国家生物技术信息中心 (NCBI) 网页 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) 通过 BLAST 进行比对,寻找与目的序列同源性最高的菌种的序列,从而确定优势菌种。

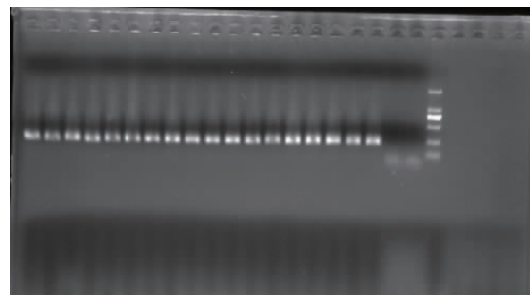
2 结果与分析

2.1 糟醅细菌 DGGE 分析

在巢式 PCR 中,应用 16S1/16S2 引物进行第一步扩增,得到大小约为 1 500 bp 的产物 (见图 2 (a)),应用 R518/338F-GC 引物进行第二步扩增,得到大小约为 240 bp 的产物 (见图 2 (b)),结果均与期望一致。



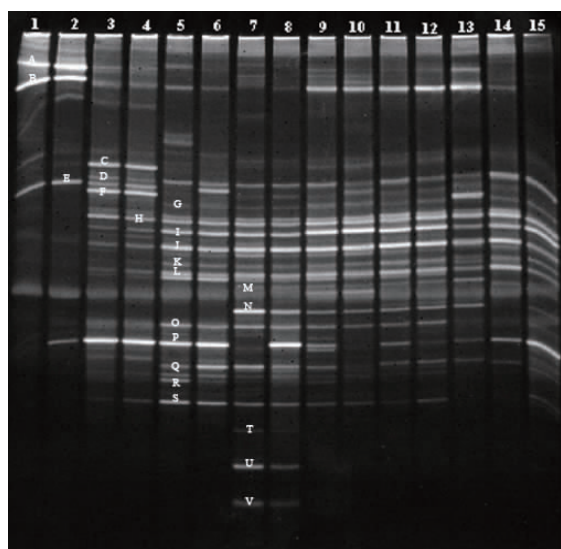
(a) 16S rDNA



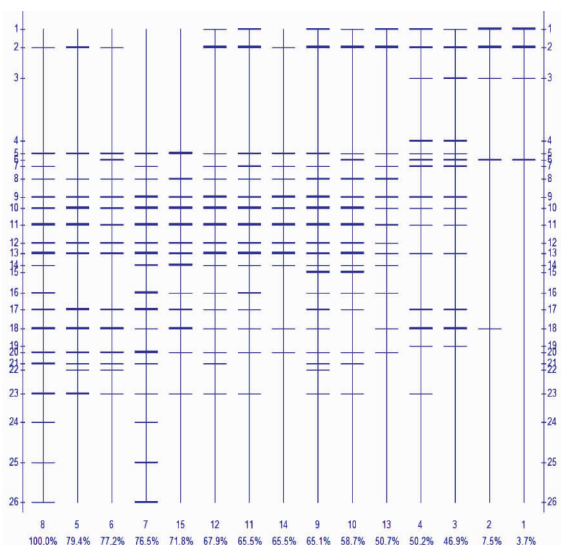
(b) 16S V3

图 2 堆积糟醅细菌 16S rDNA 和 16S V3 可变区鉴定图
Fig. 2 16SrDNA and highly variable V3 region of 16S rDNA of bacteria in stacked fermentation

经过对糟醅堆积的各个阶段即下沙、糙沙、一轮次、二轮次、三轮次、四轮次、五轮次及六轮次糟醅堆积过程中细菌多样性的跟踪检测,发现下沙期间糟醅堆积中细菌种类较少,糙沙期间细菌种类开始增多,二轮次期间细菌多样性最丰富,三轮次至四轮次堆积糟醅样品的细菌多样性大致相同,五轮次至六轮次细菌种类稍有减少,细菌鉴定详细情况见图 3 及采用 UPGAMA 算法进行的聚类分析图 4。



(a)DGGE图



(b)识别图

注:1)泳道 1、2 为下沙堆积糟醅;泳道 3、4 为糙沙堆积糟醅;泳道 5、6 为一轮次堆积糟醅;泳道 7、8 为二轮次堆积糟醅;泳道 9、10 为三轮次堆积糟醅;泳道 11、12 为四轮次堆积糟醅;泳道 13、14 为五轮次堆积糟醅;泳道 15 为六轮次堆积糟醅。2)A:不可培养细菌;B:耐酸乳杆菌;C:面包乳杆菌;D:芽孢杆菌属;E:乳酸片球菌;F:面包乳杆菌;G:布氏乳杆菌;H:*Oceanobacillus indicireducens*;I:*Bacillus thermolactis*;J:*Virgibacillus* sp.;K:*Bacillus thermolactis*;L:*Virgibacillus* sp.;M:奥克西托克雷白杆菌;N:苜蓿中华根瘤菌;O:*Ochrobactrum oryzae*;P:巴氏醋杆菌;Q:*Tsukamurella spumae*;R:*Acetobacter nitrogenifigens*;S:*Thermoactinomyces sanguinis*;T、U 和 V:直杆糖多孢菌。

图 3 堆积糟醅细菌 16S V3 可变区 DGGE 图及识别图
Fig. 3 DGGE fingerprints of 16S V3 region of bacteria in stacked fermentation and its identification chart

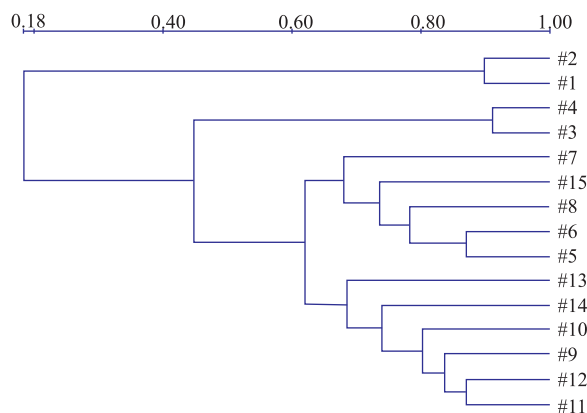


图 4 堆积糟醅细菌 16S V3 可变区样品相似性分析图
Fig. 4 UPGAMA analysis showing the phylogenetic relationship of the bacteria in stacked fermentation

2.2 糟醅真菌 DGGE 分析

在巢式 PCR 中,应用 Geo11/GeoA2 引物进行第一步扩增,得到大小约为 1 800 bp 的产物(见图 5),应用 FF390/FR1-GC 引物进行第二步扩增,得到大小约为 390 bp 的产物(见图 6),结果均与期望一致。

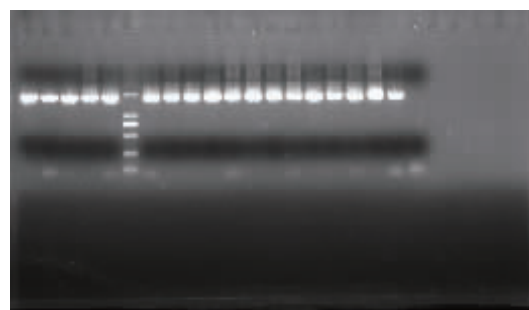


图 5 堆积糟醅真菌 18S rDNA 鉴定图

Fig. 5 18S rDNA of fungi in stacked fermentation

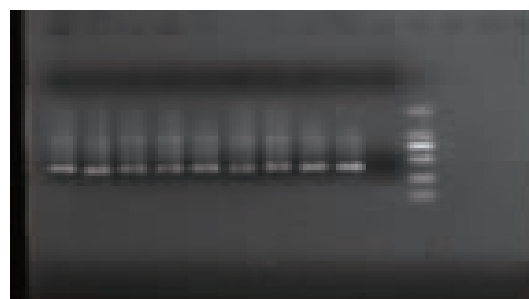
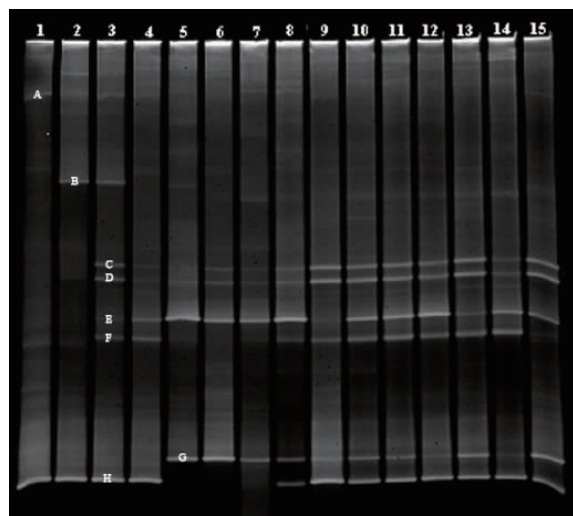


图 6 糟醅真菌 FR1/FF390 区鉴定图

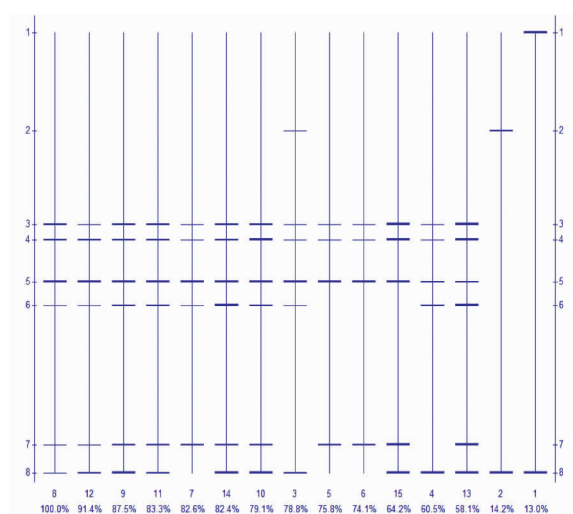
Fig. 6 FR1/FF390 region of fungi in stacked fermentation

经过对各个阶段糟醅堆积过程中真菌多样性的跟踪检测,发现堆积糟醅真菌多样性较少,没有细菌种类丰富。下沙期间糟醅堆积中真菌种类很

少,之后逐渐增多;二轮次期间真菌多样性较丰富,并在二轮次至六轮次期间,堆积糟醅的真菌多样性几乎没有变化。真菌鉴定详细情况见图7及采用UPGAMA算法进行的聚类分析图8。



(a)DGGE图



(b)识别图

注:1)泳道1、2为下沙堆积糟醅;泳道3、4为糙沙堆积糟醅;泳道5、6为一轮次堆积糟醅;泳道7、8为二轮次堆积糟醅;泳道9、10为三轮次堆积糟醅;泳道11、12为四轮次堆积糟醅;泳道13、14为五轮次堆积糟醅;泳道15为六轮次堆积糟醅。2)A:*Pichia fermentans*;B:白地霉;C:嗜酒假丝酵母;D:*Pichia fermentans*;E:亚硝酸对栗酒裂殖酵母菌;F:酿酒酵母;G:嗜酒假丝酵母;H:*Pichia fermentans*。

图7 堆积糟醅真菌FR1/FF390区DGGE图及识别图

Fig. 7 DGGE fingerprints of FR1/FF390 region of fungi in stacked fermentation and its identification chart

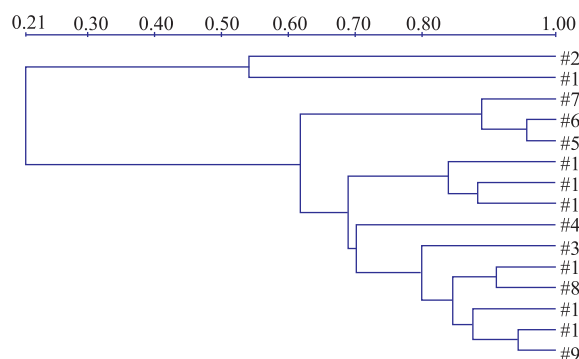


图8 堆积糟醅真菌FR1/FF390区样品相似性分析图

Fig. 8 UPGAMA analysis showing the phylogenetic relationship of the fungi in stacked fermentation

3 讨论

对酱香型白酒生产中各个轮次堆积发酵过程的优势微生物变换情况作了比较详细的分析,为今后白酒生产的生物优化技术、发酵控制技术等提供了理论依据和参考。酱香型白酒酿造中,在下沙、糙沙、一轮次、二轮次、三轮次、四轮次、五轮次及六轮次等阶段均有糟醅堆积的过程。各轮次堆积时的气候、温湿度及原料状态等条件不同,各个轮次基酒的特点也各不相同。因此本课题研究中针对各轮次堆积过程的菌种多样性进行跟踪,观察在各轮次堆积糟醅中微生物多样性的交替变换情况。经分析发现,下沙期间糟醅的细菌种类很少,只有耐酸乳杆菌、乳酸片球菌和巴氏醋杆菌。糙沙堆积期间,细菌多样性明显增加,多增了面包乳杆菌、芽孢杆菌属及 *Virgibacillus* 属的细菌。一轮次堆积时多增 *Tsukamurella spumae*、*Acetobacter nitrogenifigens*、*Thermoactinomyces sanguinis* 等细菌。二轮次堆积时细菌多样性最为丰富,多增苜蓿中华根瘤菌和直杆糖多孢菌。三轮次至四轮次堆积过程中细菌多样性几乎类似;五轮次至六轮次堆积期间细菌多样性稍有减少。细菌 16S rDNA V3 可变区 DGGE 图谱识别图显示了各个轮次堆积糟醅细菌种类与细菌多样性最为丰富的二轮次堆积糟醅细菌种类的对比结果。从图3和图4中,可以发现下沙期间细菌种类最少,其同源性少于8%;糙沙期间细菌种类开始增多,同源性在50%左右。一轮次堆积开始细菌种类同源性普遍达到70%以上。堆积过程中的真菌,其多样性不及细菌丰富。下沙堆积期间真菌种类最少,只有白地霉和 *Pichia fermentans*;糙沙堆积期间

真菌种类稍有增加,多增嗜酒假丝酵母、亚硝酸对粟酒裂殖酵母菌和酿酒酵母等;二轮次开始堆积糟醅的真菌种类趋于稳定,大致包含嗜酒假丝酵母、*Pichia fermentans*、亚硝酸对粟酒裂殖酵母菌和酿酒酵母等。真菌 FR1/FF390 区 DGGE 图谱识别图显示了各个轮次堆积糟醅真菌种类与真菌多样性最为丰富的二轮次堆积糟醅真菌种类的对比结果。从图 7 和图 8 中,可以发现下沙期间真菌种类最少,其同源性在 15% 以下;糙沙期间真菌种类开始增加,同源性可达 70%;二轮次至六轮次真菌种类较稳定,同源性大致可保持在 80% 以上。酿酒年度的初期糟醅堆积中,细菌及真菌多样性均少,加之底物是生粮,因此一轮次基酒具有生沙香突出、有生粮味的特点。随着微生物多样性的逐步增多,可发酵出更多更丰富的呈味物质,使得三、四、五轮次的基酒变

得酱香较为突出、醇和,成为酱香型白酒勾调中的大宗酒,可见微生物在酱香型白酒发酵过程中承担着重要的角色。

4 结 语

白酒酿造过程是微生物发酵的过程,也是呈味物质的产生过程。酱香型白酒酿造过程中微生物主要来自大曲和堆积过程网罗空气和环境中的微生物。其中,糟醅堆积不仅是扩大微生物数量为入窖发酵创造条件,也是酱香型白酒的香味成分或香味前体物质产生的过程。掌握堆积过程中微生物的种群变化,对于控制白酒发酵有着很重要的意义。今后要进一步探索酱香型白酒发酵机理,弄清楚各个呈味物质的生成过程,这有待白酒研究人员做更深入、更精细的微生物代谢研究。

参考文献:

- [1] 唐玉明,任道群,姚万春,等. 酱香型酒糟醅堆积过程温度和微生物区系变化及其规律性[J]. 酿酒科技,2007(5):54-58.
TANG Yuming, REN Daoqun, YAO Wanchun, et al. The change rules of temperature and microflora during the stacking of maotai-flavor fermenting grains[J]. *Liquor-Making Science and Technology*, 2007(5):54-58. (in Chinese)
- [2] 冯雨. 酱香型白酒的堆积发酵[J]. 酿酒科技,2013(2):80-81.
FENG Yu. Study on stacked fermentation of Jiang-flavor liquor [J]. *Liquor-Making Science and Technology*, 2013(2):80-81. (in Chinese)
- [3] 王贵军,沈才洪,张洪远,等. 酱香型白酒糟醅堆积与窖内发酵工艺研究[J]. 酿酒科技,2011(5):36-41.
WANG Guijun, SHEN Caihong, ZHANG Hongyuan, et al. Investigation on accumulation & in-pit fermentation of distiller's grains of maotai-flavor liquor[J]. *Liquor-Making Science and Technology*, 2011(5):36-41. (in Chinese)
- [4] 李丽,赵盈盈,曾娟,等. 传统固态发酵白酒的酿酒微生物区系研究概括[J]. 酿酒科技,2014(5):79-83.
LI Li, ZHAO Yingying, ZENG Juan, et al. A review of the research on microflora in liquor-making by traditional solid fermentation[J]. *Liquor-Making Science and Technology*, 2014(5):79-83. (in Chinese)
- [5] 黄永光,谌永前,吴广黔,等. 酱香白酒堆积发酵过程酒醅中酵母菌的分析研究[J]. 酿酒科技,2013(6):8-13.
HUANG Yongguang, CHEN Yongqian, WU Guangqian, et al. Analysis of yeast strains in fermented grains during stacking fermentation of Jiang-flavor liquor[J]. *Liquor-Making Science and Technology*, 2013(6):8-13. (in Chinese)
- [6] 张文学,乔宗伟,胡承,等. PCR 技术对浓香型白酒糟醅细菌群落的解析[J]. 四川大学学报:工程科学版,2005,37(5):82-87.
ZHANG Wenxue, QIAO Zongwei, HU Cheng, et al. Analysis of bacterial community in fermented grains during the production of Chinese strong aromatic spirits by PCR technique[J]. *Journal of Sichuan University: Engineering Science Edition*, 2005, 37(5):82-87. (in Chinese)
- [7] 张文学,乔宗伟,胡承,等. 浓香型白酒糟醅中真菌菌群的多样性分析[J]. 四川大学学报:工程科学版,2006,38(5):97-101.
ZHANG Wenxue, QIAO Zongwei, HU Cheng, et al. Fungal diversity of fermented grains during the production of Chinese strong aromatic spirits[J]. *Journal of Sichuan University: Engineering Science Edition*, 2006, 38(5):97-101. (in Chinese)
- [8] 李家民,邹永芳,王海英,等. DGGE 法初步解析浓香型白酒糟醅微生物群落结构[J]. 酿酒科技,2013(2):34-37.
LI Jiamin, ZOU Yongfang, WANG Haiying, et al. Preliminary analysis of microbial communities structure in nong-flavor fermented grains in tuopai distillery by DGGE technology [J]. *Liquor-Making Science and Technology*, 2013(2):34-37. (in Chinese)