

偏高温大曲发酵过程中可培养细菌群落研究

周瑞平¹, 王 涛², 陈云宗¹, 江东材¹, 唐代云¹, 刘 超¹

(1.四川省宜宾市叙府酒业股份有限公司技术中心, 四川 宜宾 644000;

2.宜宾学院 发酵资源与应用四川省高校重点实验室, 四川 宜宾 644000)

摘 要: 采用经典微生物学方法和16S rDNA基因系统发育分析的方法, 对偏高温大曲发酵过程中的细菌类群及其演替情况进行分析。结果显示: 在偏高温大曲发酵过程中, 细菌数量从拌料的 1.0×10^7 个/g快速上升到最大值 4.0×10^8 个/g(第一次翻曲, 4d), 最后降低到 1.5×10^7 个/g; 可培养的细菌类群从最开始的5属9种增加到9属26种后减少至第一次翻曲时(4d)的7属23种, 随后多样性持续下降, 到收曲时仅检测到1属6种。同时发现在整个发酵过程中 *Bacillus* 为绝对优势属, 在整个发酵环节均存在。

关键词: 偏高温大曲; 细菌类群演替; 16S rDNA

Culturable Bacterial Flora in the Fermentation of High-temperature Daqu

ZHOU Rui-ping¹, WANG Tao², CHEN Yun-zong¹, JIANG Dong-cai¹, TANG Dai-yun¹, LIU Chao¹

(1. Technical Center of Yibin Xufu Liquor Industry Co. Ltd., Yibin 644000, China; 2. Key Laboratory of Fermentation Resource and Application of Institutes of Higher Learning in Sichuan Province, Yibin University, Yibin 644000, China)

Abstract: Using classical microbiological methods and 16S rDNA gene phylogenetic analysis of the culturable bacterial flora in the fermentation of high-temperature Daqu, we found that the number of bacteria at the first stirring (on the 4th d) was rapidly increased to a maximum level of 4.0×10^8 CFU/g from the initial level of 1.0×10^7 CFU/g, and then was reduced to 1.5×10^7 CFU/g finally. The cultivable bacterial populations were increased to 26 species in 9 genus from 9 species in 5 genus at the beginning, and then were reduced to 23 species in 7 genus at the first stirring (on the 4th d), and during the following stages the bacterial diversity continued to reduce to 6 species in 1 genus finally. In addition, we also found *Bacillus* existed throughout the fermentation process as the dominant genus.

Key words: high-temperature Daqu; culturable bacterial flora; 16S rDNA

中图分类号: TS261.1

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630(2013)13-0198-04

doi:10.7506/spkx1002-6630-201313042

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]。正因为如此, 目前对清香型白酒、浓香型白酒及酱香型白酒曲药中微生物的相关研究已有较多报道^[3-5], 但对曲药发酵过程中细菌类群的变迁却研究较少且不够系统。

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^[6]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℃)。对偏高温大曲发酵过程中的细菌群落及其演替开展较为系统的研究, 不仅

有利于进一步完善、提高多粮浓酱兼香型白酒工艺, 对于探究固态多菌种发酵体系中温度对微生物群落、代谢产物的影响(机制)亦有重要的借鉴价值。同时, 这些菌株也是潜在的资源, 具有在白酒乃至其他行业应用的前景。

1 材料与方法

1.1 样品采集

分别在制曲过程的拌料(0d)、立曲收汗(0d)、第一次翻曲(4d)、第二次翻曲(10d)、堆烧(18d)、收曲(40d)时采集样品。拌料样品为拌合均匀的小麦粉, 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。

收稿日期: 2012-04-26

基金项目: 四川省科技厅科技支撑计划项目(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)

作者简介: 周瑞平(1975—), 男, 工程师、高级技师, 本科, 主要从事酿酒微生物、酿酒工艺研究。E-mail: xufu9@126.com

1.2 试剂与仪器

菌株DNA提取、16S rDNA片段扩增所用的各种酶、Marker、dNTPs、Buffer等 生工生物工程(上海)股份有限公司; 其余试剂均为国产分析纯。

PCR仪 美国Bio-Rad公司。

1.3 方法

1.3.1 细菌菌落总数计数

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[7], 计数参考文献[8]。

1.3.2 分离、纯化

每个样品计数后, 选取菌落数在30个以下的平板, 挑取菌落划线纯化3次后保存。

1.3.3 培养物DNA提取和16S rDNA PCR扩增

根据文献[9]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'-AGAGTTTGATCTGGCTCAG-3'和1541r: 5'-AAGGAGGTGATC CAGCCGCA-3'^[10]。PCR反应体系和反应条件参照东秀珠等^[11]的方法进行。

1.4 16S rDNA部分序列分析

扩增的PCR产物送生工生物工程(上海)股份有限公司(Sangon)纯化并测序, 测序长度1000~1100bp, 所得序列(包含V1~V6可变区)用EzTaxon Server 2.0在线进行相似性分析^[9], 如相似性低于97%则对16S rDNA进行全序列测序比对。

用ClustalX按照最大同源性的原则进行排序, 采用Kimura-2计算核苷酸差异值^[12], 并用BioEdit 5.0.9进行检验, 最后用Neighbor-Joining法构建系统进化树, 自展数(bootstrap)为1000^[11]。

2 结果与分析

2.1 偏高温大曲发酵过程中细菌数量变化

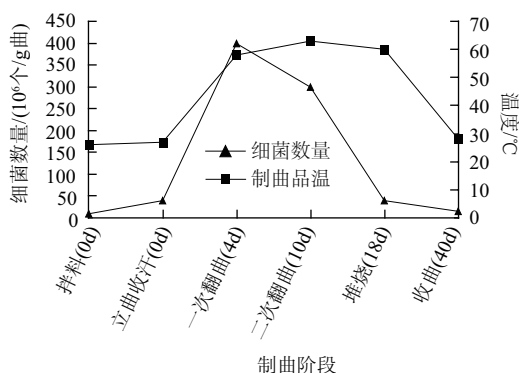


图1 曲药发酵过程中细菌数量及制曲品温变化

Fig.1 Changes in bacterial count and temperature during Daqu fermentation

由图1可知, 偏高温大曲中细菌数量在发酵的不同阶段呈现先增加、后降低的变化趋势。拌料阶段的细菌数量较少(1.0×10^7 个/g曲), 通过短暂的立曲收汗细菌数量即增加约3倍, 达到 4.0×10^7 个/g曲; 经过4d发酵, 到第一次翻曲时细菌数达到峰值(4.0×10^8 个/g曲); 随后细菌数量开始下降, 到第二次翻曲(10d)时达到 3.0×10^8 个/g曲; 此后急剧降低, 堆烧和收曲阶段, 细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。

曲药中细菌数量变化的情况与偏高温大曲生产过程中温度变化情况是吻合的。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细菌, 但此时细菌并未增殖, 使得细菌数量低。随着发酵的进行, 各类细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(细菌数量达到最高点时的品温 58°C)细菌数量达到顶峰。随后, 从第一次翻曲至堆烧长达14d的时间内, 曲药温度一直维持在顶温附近($60 \sim 63^\circ\text{C}$), 使得大量不能耐受高温的细菌死亡从而数量急剧下降, 可耐受一定高温的细菌在忍受一定时间高温胁迫后也逐渐死亡, 到发酵后期, 由于水分大量挥发损失(水分含量 $<15\%$)及微生物代谢废物的积累, 曲药中的环境愈发不再适合大多数细菌的生长, 细菌总数进一步下降, 推测此时可检测到的细菌多为产芽孢细菌。

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116株纯培养物, 其中拌料11株, 立曲收汗30株, 一次翻曲34株, 二次翻曲22株, 堆烧12株, 收取7株。

2.2.2 纯培养物的系统发育分析

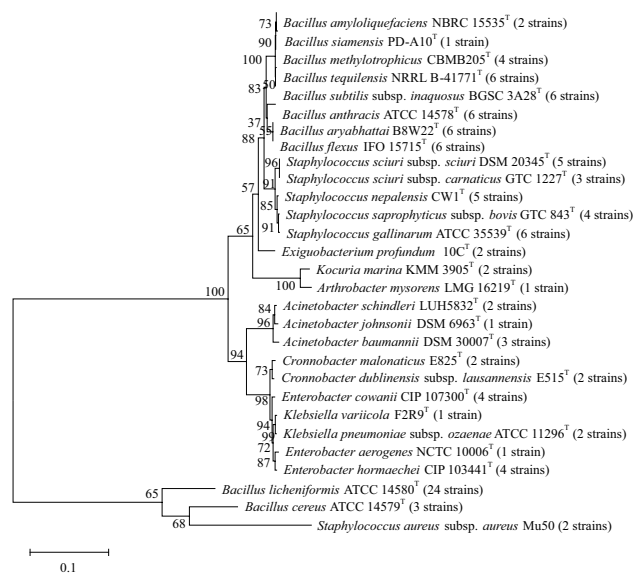


图2 116株纯培养物基于16S rDNA基因序列的系统发育树

Fig.2 Neighbour-Joining tree showing the phylogenetic relationships among 16S rDNA gene sequences from 116 strains

116株纯培养物的系统发育树如图2所示。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116株细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115株菌与GenBank中9个属、29个种的模式菌株序列的相似度≥98%。其中,*Bacillus*有64株,占到55.2%,为绝对优势属;*B. licheniformis* 24株,占20.7%,为绝对优势种。

2.2.3 偏高温大曲发酵过程中细菌类群的演替情况

表1 偏高温大曲发酵过程中细菌类群的演替情况
Table 1 Succession of bacterial flora during high-temperature Daqu fermentation

属	种	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	2	24
	<i>B. aryabhattai</i>	1		2	1	1	1	6
	<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		2	1	1	1	6
	<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
<i>Staphylococcus</i>	<i>S. saprophyticus</i> subsp. <i>bovis</i>		1	2	1			4
	<i>S. sciuri</i> subsp. <i>sciuri</i>	2	1	1	1			5
	<i>S. gallinarum</i>	1	1	4				6
	<i>S. nepalensis</i>		1	1	1	2		5
	<i>S. aureus</i> subsp. <i>aureus</i>		1	1				2
	<i>S. sciuri</i> subsp. <i>carnaticus</i>		1	1	1			3
<i>Cronobacter</i>	<i>C. malonicus</i>		1	1				2
	<i>C. dublinensis</i> subsp. <i>lausannensis</i>		1	1				2
<i>Klebsiella</i>	<i>K. variicola</i>		1					1
	<i>K. pneumoniae</i> subsp. <i>ozaenae</i>		1	1				2
<i>Enterobacter</i>	<i>E. aerogenes</i>		1					1
	<i>E. hormaechei</i>	1	1	1	1			4
	<i>E. cowanii</i>		1	1	2			4
	<i>A. baumannii</i>	1	1	1				3
<i>Acinetobacter</i>	<i>A. schindleri</i>		1	1				2
	<i>A. johnsonii</i>		1					1
<i>Kocuria</i>	<i>K. marina</i>	1	1					2
	<i>Arthrobacter</i>		1					1
<i>Exiguobacterium</i>	<i>E. profundum</i>		1	1				2
	菌株数	11	30	34	22	12	7	116
	属数	5	9	7	3	2	1	9
	种数	9	26	23	14	8	6	29

由表1可知,拌料时检测到分属于5属9种的细菌类群,拌料、踩曲完成后进入曲房中立曲收汗后,曲药中可培养细菌多样性大幅度增加,检测到分属于9属26种的细菌类群。其中,从属一级分类单位来看,拌料时和立汗收曲时呈现高度一致性,仅在立曲收汗时多检测到1个属的细菌*Arthrobacter*;从种一级分类单位来看,*Acinetobacter johnsonii*仅在拌料时检测到,*B. siamensis*、*K. variicola*、*E. aerogenes*、*K. marina*等

4个种的细菌仅在立曲收汗时检测到。无论从属还是种一级分类单位,立曲收汗时样品中细菌多样性都要高于拌料时的样品,这充分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细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产具有重要作用的细菌类群。在一次翻曲后,可培养细菌类群多样性略有下降。样品中检测到分属于7属23种的细菌类群,相对于立曲收汗,属一级分类单位减少2个(*Kocuria*、*Arthrobacter*),种一级单位减少5个(*B. cereus*、*K. variicola*、*E. aerogenes*、*K. marina*、*A. mysorens*),这表明从立曲收汗到第一次翻曲期间,急剧升高的温度已开始对偏高温大曲中细菌类群进行筛选。

二次翻曲后仅检测到3属14种的细菌。相对于第一次翻曲时,无论是属还是种一级水平上细菌类群都急剧减少,这显示偏高温大曲发酵过程中的第一次翻曲至二次翻曲期间,发酵过程对细菌的筛选进一步加剧。在堆烧后,偏高温大曲中检测到分属于2属8种的细菌类群,相对于第二次翻曲时减少了1属6个种的细菌,这显示从第二次翻曲直至堆烧过程中,细菌属种的多样性持续降低,但降低速度明显减缓。最终(收曲时),偏高温大曲中仅检测到了分属于*Bacillus*的6个种,相对于堆烧环节,细菌类群减少了1属2种。

纵观偏高温大曲发酵过程中可培养细菌类群多样性变化情况,在经过拌料、踩曲后的立曲收汗阶段细菌的多样性最为丰富,随后开始逐渐下降至最后的1属6个种。从属一级分类单位来看,从最开始能够检测到的9个属,最后仅检测到了1个属;从种一级分类单位来看,从最多能够检测到的26个种,到最后仅能检测到6个种。而且,多样性降低最为迅速(剧烈)的环节为第一次翻曲至第二次翻曲之间,而此时正是偏高温大曲发酵过程中温度升至并稳定在最高温度的阶段,这在相当程度上表明偏高温大曲发酵温度是筛选(选择)大曲中功能微生物类群的主要因素。

在总共分析的116株细菌中,*Bacillus*和*B. licheniformis*分别为属一级和种一级的优势分类单位。从偏高温大曲发酵的各个阶段来看,*Bacillus*的菌株在各个阶段属一级分类单位中所占的比例均最大(分别为36.4%、43.3%、47.1%、68.2%、66.7%、100%)且所占比例在发酵过程中呈现线性上升;这与多数研究中浓香型及酱香型白酒大曲细菌以芽孢杆菌为主的结论相同。

值得注意的是,本实验发现在第二次翻曲后*B. licheniformis*开始在大曲中占据优势,可能是由于二次翻曲前曲醅环境有利于绝大部分细菌生长,二次翻曲后绝大部分种(尤其是非芽孢杆菌)的衰亡才确立了*B. licheniformis*的主导地位。而周新虎等^[15]虽然都发现*Bacillus*为浓香型白酒大曲中的绝对优势属,但均没有明确*B. licheniformis*为绝对优

势种,造成差异的主要原因可能为:1)制曲环境、气候和工艺差异导致细菌区系的差异;2)纯培养手段所采用的培养基及培养条件的差异导致细菌区系的差异。本研究与张明春等^[16]“白云边大曲微生物分析研究”结果较为接近,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),但制曲环境的及细菌培养条件的不同导致了两者存在一定的差异。据报道*B. licheniformis*该种细菌可产淀粉酶、蛋白酶及多种白酒风味物质^[5],可能对浓香型大曲风味形成有重要意义。

3 结 论

偏高温大曲发酵过程中可培养细菌的种属在拌料、踩曲后最丰富,菌数在一次翻曲时达到最高值,随后均呈逐渐下降趋势。可培养细菌数量及其多样性的变化与偏高温大曲的发酵温度变化之间存在直接对应关系。其中细菌数量经拌料、踩曲后达到一次翻曲的最高峰,后急剧衰亡至堆烧,收取时与拌料和立曲收汗的数量相当;细菌多样性由拌料上升至立曲收汗的最大,小幅减少至一次翻曲,后急剧降低至二次翻曲,缓慢减少至收曲后趋于稳定;温度呈现前缓中挺后缓落现象,一次翻曲至堆烧温度稳定在顶温附近(此阶段也是细菌数量和多样性呈现急剧降低的时期),显示提高培曲品温对大曲最终的生产(功能)菌株的筛选作用重大。*Bacillus*和*B. licheniformis*分别为偏高温大曲发酵过程中的绝对优势属和优势种。

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] 潘勤春,孟镇,钟其顶,等.汾酒大曲细菌群落结构的PCR-DGGE分析[J].酿酒科技,2011(6):95-99.
- [4] 罗惠波,黄治国,李浩,等.浓香型大曲原核微生物群落的PCR-SSCP解析[J].微生物学通报,2009,36(9):1363-1367.
- [5] 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.
- [6] 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.
- [7] 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.
- [8] AVILA C L, BRAVO MARTINS C E, SCHWAN R F. Identification and characterization of yeasts in sugarcane silages[J]. Journal of Applied Microbiology, 2010, 109(5): 1677-1686.
- [9] KIMURA M. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences[J]. J Mol Evol, 1980, 16(2): 111-120.
- [10] BROSIUS J, DULL T J, SLEETER D D, et al. Gene organization and primary structure of a ribosomal DNA operon from *Escherichia coli*[J]. J Mol Biol, 1981, 148(2): 107-127.
- [11] 东秀珠,蔡妙英.常见细菌系统鉴定手册[M].北京:科学出版社,2001:353-358.
- [12] SAITOU N, NEI M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees[J]. Mol Biol Evol, 1987, 4(4): 406-425.
- [13] DEVEREUX R, HE S H, DOYLE C L, et al. Diversity and origin of *Desulfovibrio* species: phylogenetic definition of a family[J]. Bacteriol, 1990, 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.