

张颖, 李霄霄, 李景辉, 等. 高产四甲基吡嗪芽孢杆菌的筛选及其对酱香型白酒堆积过程的影响 [J]. 食品工业科技, 2022, 43(2): 142–149. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2021050066

ZHANG Ying, LI Xiaoxiao, LI Jinghui, et al. Screening of High-yielding Tetramethylpyrazine *Bacillus* and Its Effect on the Accumulation Process of Maotai-flavor Liquor[J]. Science and Technology of Food Industry, 2022, 43(2): 142–149. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2021050066

高产四甲基吡嗪芽孢杆菌的筛选及其对酱香型白酒堆积过程的影响

张颖¹, 李霄霄¹, 李景辉¹, 刘小敏¹, 谢翔云¹, 卢君², 李长文², 张翠英¹, 肖冬光^{1,*}

(1. 天津科技大学生物工程学院, 天津 300457;
2. 贵州国台酒业股份有限公司, 贵州仁怀 564501)

摘要: 为提高和稳定白酒中四甲基吡嗪含量, 本研究从酱香大曲样品中分离出 13 株芽孢杆菌, 通过蛋白酶透明圈试验初筛, 选出 5 株产蛋白酶优良菌株。经过液态发酵试验筛选出一株高产四甲基吡嗪的功能菌, 其发酵液中的四甲基吡嗪含量为 12.22 mg/L, 鉴定为地衣芽孢杆菌 GTBL-168。将该菌株的种子培养液按 0%、3%、5% 和 7% (v/w) 接种到酱香型白酒堆积培养中与传统大曲协同发酵, 堆积糟醅中乙偶姻和四甲基吡嗪的含量均有提高, 其中接种量为 7% 时增量最大, 四甲基吡嗪产量比对照组提高 24.88%; 理化指标总体变化较明显, 氨基氮和总酸有所增加; 地衣芽孢杆菌 GTBL-168 的添加对堆积糟醅的菌群结构影响不大, 随着接种量的增加糟醅中芽孢杆菌属等各优势菌属丰度也随之增加。为功能菌在堆积过程中的应用研究奠定了基础。

关键词: 酱香型白酒, 功能芽孢杆菌, 四甲基吡嗪, 乙偶姻, 堆积发酵

中图分类号: Q815

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2022)02-0142-08

DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2021050066

本文网刊:



Screening of High-yielding Tetramethylpyrazine *Bacillus* and Its Effect on the Accumulation Process of Maotai-flavor Liquor

ZHANG Ying¹, LI Xiaoxiao¹, LI Jinghui¹, LIU Xiaomin¹, XIE Xiangyun¹, LU Jun², LI Changwen², ZHANG Cuiying¹, XIAO Dongguang^{1,*}

(1. College of Bioengineering, Tianjin University of Science and Technology, Tianjin 300457, China;

2. Guizhou Guotai Distillery Co., Ltd., Renhuai 564501, China)

Abstract: In order to increase and stabilize the content of tetramethylpyrazine in liquor, 13 strains of *Bacillus* were isolated from Maotai Daqu samples, and 5 strains with excellent protease production were selected through the preliminary screening of protease transparent circle test. After a liquid fermentation test, a functional bacterium with high yield of tetramethylpyrazine was screened out. The content of tetramethylpyrazine in the fermentation broth was 12.22 mg/L, which was identified as *Bacillus licheniformis* GTBL-168. The seed culture solution of this strain was inoculated into the sauce-flavor liquor accumulation culture at 0%, 3%, 5%, and 7% (v/w) to synergize the fermentation with traditional Daqu, and accumulate acetoin and tetramethyl in the glutinous rice grains. The content of pyrazine increased, and the increasing was the largest when the inoculation amount was 7%, and the yield of tetramethylpyrazine increased by 24.88% compared with the control group, the overall changes in physical and chemical indexes were obvious, and the amino nitrogen and total acid increased, the addition of *Bacillus licheniformis* GTBL-168 had little effect on the microbial structure of the accumulated fermented grains. With the increasing of the inoculation amount, the abundance of *Bacillus* and other dominant bacteria in the fermented grains also increased. It would lay a foundation for the application of functional bacteria in the process of stacking fermentation.

Key words: Maotai-flavor liquor; functional *Bacillus*; tetramethylpyrazine; acetoin; stacking fermentation

收稿日期: 2021-05-12

基金项目: 国家重点研发计划 (2016YFD04005)。

作者简介: 张颖 (1995-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 微生物, E-mail: 415410113@qq.com。

* 通信作者: 肖冬光 (1956-), 男, 硕士, 教授, 研究方向: 现代酿造, E-mail: xiao99@tust.edu.cn。

四甲基吡嗪(tetramethyl pyrazine, TTMP), 是一种天然的香料, 具有烤焙、坚果、可可等香气, 可以作为风味添加剂^[1]。TTMP 也是白酒中重要风味物质的组成成分, 赋予白酒一定的保健作用, 在不同香型的白酒中含量不同, 在酱香型白酒中含量最高。白酒酿造过程中 TTMP 主要是由芽孢杆菌发酵代谢合成, 一方面微生物通过糖酵解途径产生丙酮酸, 两分子丙酮酸缩合形成 α -乙酰乳酸, 在 α -乙酰乳酸脱羧酶的作用下生成乙偶姻; 另一方面微生物酶分解原料中蛋白质和氨基酸产生氨, 进而乙偶姻和氨发生非酶促反应合成 TTMP。

通过分离筛选高产 TTMP 的微生物进而来稳定和提高白酒中四甲基吡嗪含量是一种常用的手段, 徐岩等^[2]将具有相应酿造功能的微生物菌剂进行复配组合, 使用菌剂生产的芝麻香型白酒头段酒中的吡嗪类物质含量达到 175 $\mu\text{g/L}$, 相比未使用菌剂提高了 33.6%。袁建国等^[3]通过添加芽孢杆菌 B-010, 使芝麻香型白酒中的 TTMP 含量由 0.4 mg/L 提高到 1.8 mg/L ; 张温清^[4]将高产 TTMP 芽孢杆菌菌液接入芝麻香型白酒堆积糟醅中培菌后入窖发酵, 结果发现, 接种功能菌 XJB-104 原酒中 TTMP 含量从 0.06 mg/L 增加到 1.39 mg/L ; 王晓丹等^[5]从高温大曲中分离得到的地衣芽孢杆菌添加到窖池中层的糟醅中, 按照粹沙工艺制酒取样, 结果最佳菌株添加量为 5%, 此时发酵后的酒醅 TTMP 含量为 6.81 $\mu\text{g/g}$, 是对照组的 3.03 倍, 酒样中 TTMP 相对百分含量为 0.028%。

TTMP 在酱香型、芝麻香型和兼香型白酒中的含量显著高于其它香型白酒的主要原因, 是都有堆积培菌过程, 在堆积糟醅中有较高的含氧量, 有利于好氧芽孢杆菌的生长代谢, 合成较多的 TTMP。如直接入窖发酵, 糟醅中的氧在发酵前期很快被兼性厌氧的酵母菌等微生物耗尽, 好氧芽孢杆菌的生长与 TTMP 的合成将受到限制。本研究从酱香型白酒大曲中筛选出的 1 株高产 TTMP 的地衣芽孢杆菌, 并将其种子液添加到酱香型白酒第 5 轮次的酒醅中进行堆积培菌, 探究地衣芽孢杆菌对堆积培菌过程的影响, 进而探讨在酱香白酒生产中使用的可行性, 旨在通过该菌剂强化堆积培菌过程提高白酒中的 TTMP 含量, 从而改善白酒的品质。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

糟醅、高温大曲 贵州国台酒业公司; 氢氧化钠、斐林试剂、葡萄糖、硫酸、甲醛、盐酸等 均为国产分析纯; 四甲基吡嗪、乙偶姻、无水乙醇 色谱纯, 上海阿拉丁生化科技股份有限公司; DNA 提取试剂盒 成都福际生物技术有限公司。

7890B 气相色谱仪、1200SL 液相色谱仪 美国安捷伦科技有限公司; CX21FS1 型生物显微镜 日本 OLYMPUS 会社; LD5-10 离心机 北京医用离

心机厂。

1.2 实验方法

1.2.1 培养基与溶液 分离培养基的配制。LB 培养基: 蛋白胨 20 g/L , 酵母浸粉 5 g/L , NaCl 10 g/L , pH 7.2, 于 121 $^{\circ}\text{C}$ 灭菌 20 min。

酪蛋白琼脂培养基的配制。干酪素 10.0 g , 牛肉膏 3 g , 氯化钠 5 g , 磷酸氢二钠 2 g , 琼脂 20 g , 加蒸馏水定容至 1000 mL , pH 为 7.0~7.2, 121 $^{\circ}\text{C}$ 灭菌 20 min。

一级种子培养基的配制。LB 培养基: 蛋白胨 20 g/L , 酵母浸粉 5 g/L , NaCl 10 g/L , pH 7.2, 于 121 $^{\circ}\text{C}$ 灭菌 20 min。

代谢发酵培养基的配制。12°BX 高粱水解液, 酵母浸粉 15 g/L , K_2HPO_4 5 g/L , NaCl 5 g/L , pH 调至 6.0, 于 115 $^{\circ}\text{C}$ 灭菌 20 min。

固态发酵培养基。贵州国台酒第 5 轮次蒸酒后糟醅。

0.1 mol/L PBS 缓冲液: A 液(0.1 mol/L KH_2PO_4): 1.361 g KH_2PO_4 溶于 100 mL 蒸馏水; B 液(0.1 mol/L Na_2HPO_4): 1.78 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 溶于 100 mL 蒸馏水; A 液与 B 液按照 1:19 的比例混合, pH 为 8.0, 于 115 $^{\circ}\text{C}$ 湿热灭菌 20 min。

1.2.2 高产蛋白酶活力芽孢杆菌菌株的分离与筛选

1.2.2.1 菌种分离 称取大曲粉 10 g , 放入含有 90 mL 无菌生理盐水的三角瓶, 在 85 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 10 min, 以 200 r/min 转速在 37 $^{\circ}\text{C}$ 振荡培养箱过夜扩培, 吸取培养液 1 mL , 放入装有 9 mL 无菌生理盐水的试管内, 吹吸混匀, 按上述操作继续稀释, 稀释到 1×10^{-6} , 取稀释度为 1×10^{-4} ~ 1×10^{-6} 各 1 mL 分别涂板分离, 以 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 24 h。分离出不同菌落形态的菌株, 将菌株划线纯化, 于 -80 $^{\circ}\text{C}$ 下超低温保存。

1.2.2.2 高产蛋白酶活力菌株的筛选 蛋白酶透明圈实验: 将分离得到的菌株用酪蛋白琼脂培养基做透明圈实验, 以透明圈作为考察指标进行初筛。将菌株以点接法接种到酪蛋白琼脂培养基上, 37 $^{\circ}\text{C}$ 倒置培养 1 d 后观察透明圈大小, 并用直尺测量透明圈直径 $D(\text{mm})$ 和菌落直径 $d(\text{mm})$ 的比值(D/d), 选出能产生较大透明圈的菌株。

1.2.3 高产 TTMP 菌株的筛选与分子鉴定

1.2.3.1 高产 TTMP 菌株的筛选 一级培养: 将分离出的芽孢杆菌经活化后接入 LB 种子培养基培养 24 h。

代谢发酵: 按 5% 接种量接入装有 50 mL 代谢培养基的 250 mL 三角瓶中, 以 200 r/min 转速在 43 $^{\circ}\text{C}$ 下振荡培养 84 h。代谢发酵结束后, 利用 HPLC 检测发酵液中乙偶姻和四甲基吡嗪含量。

1.2.3.2 分子鉴定 采用细菌 DNA 提取试剂盒对各菌株提取菌株基因组 DNA, 利用细菌通用引物 27F/1492R 进行 PCR 扩增, PCR 产物交由上海金唯

智公司进行测序鉴定,对菌株进行 16S rDNA 序列分析。

1.2.4 地衣芽孢杆菌 GTBL-168 对酱香型白酒堆积过程的影响 在糟醅中加入 7% 的大曲粉拌匀,每个 250 mL 三角瓶中分装 120 g,挑选代谢发酵液中 TTMP 含量最高的菌株,将其发酵液作为种子液按照 0%、3%、5%、7% 的比例接种于拌有大曲的糟醅中,拌匀,6 层纱布封口,30 ℃ 堆积 12 h,37 ℃ 堆积 36 h,在无菌条件换成胶塞后继续在 45 ℃ 下堆积 24 h,同时做平行实验,测定堆积结束后糟醅的乙偶姻和 TTMP 含量、理化指标及菌群结构。

1.2.5 乙偶姻含量的检测方法 发酵液样品的前处理:取发酵液 2 mL,12000 r/min 离心 5 min,取上清,用流动相 5 mmol/L 的稀硫酸溶液稀释 10 倍后用 0.22 μm 的微孔滤膜过滤,直接进样。

堆积糟醅样品的前处理:取 10 g 糟醅加 100 mL 蒸馏水超声 30 min,12000 r/min 离心 2 min,取上清液经 0.22 μm 的水相膜过滤后进行液相色谱检测。

高效液相色谱条件:Agilent HPX-87H 色谱柱(300 mm×7.8 mm×9 μm),检测器为示差检测器(RID)(45 ℃),柱温 65 ℃,流动相为 5 mmol/L 的稀硫酸溶液,流速为 0.6 mL/min,进样量 20 μL。

采用 HPLC 检测乙偶姻含量,通过外标法进行乙偶姻的定量分析,标准回归方程为 $y=190998x-52137$, $R^2=0.9935$ 。

1.2.6 TTMP 含量的检测方法

1.2.6.1 发酵液中 TTMP 的测定方法 样品的前处理:取发酵液 2 mL,12000 r/min 离心 5 min,取上清,用 40% 乙醇溶液稀释 10 倍后用 0.22 μm 的微孔滤膜过滤,直接进样。

高效液相色谱条件:色谱柱为 Eclipse Plus C₁₈(4.6×250 mm),紫外(Ultra Violet, UV)检测器,以甲醇:水(v/v)=35:65 作为流动相,柱温 40 ℃,流速为 1 mL/min,检测波长 278 nm,检测时间 45 min,进样量 20 μL。

采用 HPLC 检测发酵液中 TTMP 含量,通过外标法进行 TTMP 的定量分析,标准回归方程为 $y=63.563x-0.4614$, $R^2=1$ 。

1.2.6.2 堆积糟醅中 TTMP 的检测方法 样品的前处理:取 50 g 堆积培养结束后的糟醅加 5 mL 无水乙醇和 200 mL 蒸馏水进行蒸馏,接取 100 mL 馏分,将馏分经 0.22 μm 无机滤膜过滤后直接进样进行气相色谱分析,分析馏分中 TTMP 含量。

气相色谱条件:色谱柱 HP-INNOWAX(30 m×320 μm×0.25 μm);载气为纯度 99.99% 的氮气;柱流速为 0.8 mL/min;进样口温度 200 ℃;检测器温度 150 ℃;程序升温,起始温度 50 ℃,保持 8 min,以 5 ℃/min 升至 150 ℃,保持 15 min;进样体积为 1 μL;分流进样,分流比为 10:1。

采用 GC 检测堆积糟醅中 TTMP 含量,通过外

标法进行 TTMP 的定量分析,标准回归方程为 $y=212.9x-230.85$, $R^2=0.9995$ 。

1.2.7 堆积糟醅理化指标的测定 酸度的测定:采用酸碱滴定指示剂法;残淀粉的测定:采用斐林试剂法;氨基酸态氮的测定:酸度计法;残糖的测定:斐林试剂法。具体参照 DB 34/T 2264-2014《固态发酵酒醅分析方法》^[6]。

1.2.8 糟醅群落组成分析

1.2.8.1 样品的前处理 将 100 mL PBS 缓冲液(pH8.0)和酒醅样品充分混合,使用布氏漏斗过滤混合液体,并用 200 mL PBS 缓冲液冲洗滤渣 3~5 次。将滤液在 7000 r/min、4 ℃ 条件下离心 10 min,收集底部菌泥于-20 ℃ 保存。

1.2.8.2 群落组成分析 将预处理后的样品送至上海派诺森生物科技有限公司进行 16S 和 ITS 测序,按照 QIIME2 dada2 分析流程进行序列去噪或 OTU 聚类,使用云平台分析菌落多样性指数及群落组成变化情况。

1.3 数据处理

使用 SPSS23 分析实验数据,各实验均重复 3 次,所有数据均通过方差(ANOVA)方法进行分析,所有均值均以 $P<0.05$ 的水平进行分离。通过差异分析了不同实验数据的意义。所得数据均使用 Origin 软件绘制数据柱状图。基于 Illumina MiSeq 测序平台,群落组成图利用 R 语言工具进行绘制。

2 结果与分析

2.1 高产蛋白酶活力芽孢杆菌菌株的分离与筛选

蛋白酶分解蛋白质生成的氨基酸为酿造体系提供 N 源,同时也是风味前体物质,氨基酸进一步分解生成氨,为合成 TTMP 提供了前体物质。按照 1.2.2.2 的方法进行蛋白酶透明圈实验,测得其透明圈直径与菌落直径比值 HC 值,结果如表 1 所示。菌株 144 的 HC 值最大,说明其对培养基中干酪素的分解利用能力较强,即产蛋白酶的活力较高。挑选 HC 值大于等于 1.3 的菌株进行液态代谢发酵。

表 1 透明圈 HC 值

Table 1 HC value of the transparent circle

菌株编号	菌落直径(mm)	透明圈直径(mm)	HC值(D/d)
144	10.00	24.00	2.40
10	12.00	21.00	1.75
168	10.00	14.00	1.40
152	15.00	20.00	1.30
90	20.00	26.00	1.30
163	28.00	36.00	1.29
37	14.00	18.00	1.29
138	14.00	18.00	1.29
24	24.00	30.00	1.25
125	24.00	30.00	1.25
122	34.00	42.00	1.24
208	25.00	30.00	1.20
198	32.00	34.00	1.06

2.2 产 TTMP 芽孢杆菌的筛选与鉴定

白酒中的 TTMP 由乙偶姻和氨反应生成。按照 1.2.5 和 1.2.6 的方法测定发酵液中乙偶姻和 TTMP 的含量,实验结果如图 1 所示。5 株芽孢杆菌中有 2 株产 TTMP,其中菌株 GTBL-168 产乙偶姻含量为 17.51 g/L,产 TTMP 含量为 12.22 mg/L。对照表 1 蛋白酶活性大小,菌株 GTBT-144 虽具有较高的蛋白酶活力,但产乙偶姻较少,而菌株 GTBT-90 乙偶姻含量较多,但蛋白酶活力相对较低,均未合成 TTMP。因此,高产 TTMP 的功能菌筛选需同时具有较高的产蛋白酶和乙偶姻能力,该菌才可能代谢生成高含量的 TTMP。

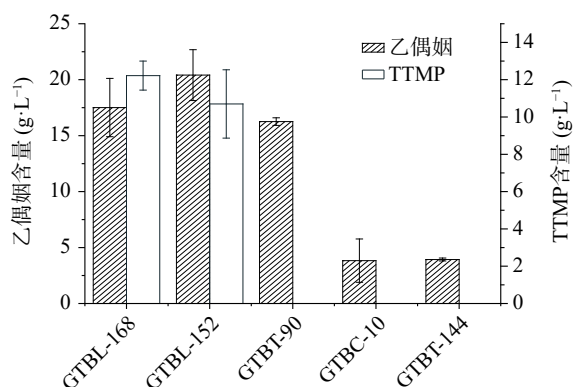


图 1 液态发酵液中乙偶姻、TTMP 含量

Fig.1 Content of acetoin and TTMP in liquid fermentation broth

按照 1.2.3.2 的方法,将菌株 GTBL-168 测序结果提交至 NCBI,并进行 BLAST 同源性比对,菌株 GTBL-168 与地衣芽孢杆菌的同源性达到 99% 以上,用 MEGA5.0 构建系统发育树(图 2)。通过系统发育树分析,将菌株 GTBL-168 鉴定为一株地衣芽孢杆菌(*Bacillus licheniformis*)。

2.3 地衣芽孢杆菌 GTBL-168 对堆积过程酒醅理化指标的影响

在酒的生产过程中,受不同的原料、菌种和生产

工艺等因素的影响,酒的风味各有不同,酱香型白酒独特的高温堆积和高温制曲工艺对酱香风味有重要作用。在堆积过程加入功能芽孢杆菌与传统大曲协同堆积发酵,影响菌群结构,酒醅的理化指标受到影响,从而影响酒的质量。

按照方法 1.2.7 测定堆积后糟醅的理化指标,结果如图 3 所示,在堆积过程结束后的糟醅中,相比于对照组实验,功能芽孢杆菌的添加对堆积过程各理化指标影响较明显,当接种量为 7% 时,总酸含量和氨基氮含量有所增加,氨基氮的增加促进了产酸菌的生长,从而总酸含量也有所提高。地衣芽孢杆菌所产蛋白酶最适作用 pH 为 7.0^[7],而糟醅酸度较大,不适于蛋白酶发挥作用,因此氨基氮含量较对照组差异不显著,芽孢杆菌接种量不断增加至 7% 时,才有一定的积累。

2.4 地衣芽孢杆菌 GTBL-168 对堆积糟醅中乙偶姻和 TTMP 含量的影响

按照方法 1.2.5 和 1.2.6 分别检测糟醅中乙偶姻的含量和糟醅馏分中 TTMP 的含量,结果如图 4 所示,加菌组较空白组的酒醅中乙偶姻含量随接种量的增加而增加,当接种量为 7% 时乙偶姻含量为 6.05 g/L,较对照组 2.23 g/L 增加了 171.30%,同时 TTMP 含量也有所增加,当接菌量为 7% 时含量为 2.66 mg/L,比对照组增加了 24.88%。据报道乙偶姻和氨合成 TTMP 的最适 pH 为 6.5^[8],本次堆积实验中乙偶姻提高幅度大,而 TTMP 增加幅度较小,可能是由于白酒糟醅酸度较大,且体系中氨的含量较少,不利于乙偶姻转化合成 TTMP。

2.5 地衣芽孢杆菌 GTBL-168 对堆积过程菌群结构的影响

利用 16S、ITS 测序技术对添加不同量功能菌进行堆积发酵实验后的糟醅中微生物进行多样性分析。对测序结果进行嵌体过滤,得到有效数据,后续所有分析将建立在有效数据的基础上进行。

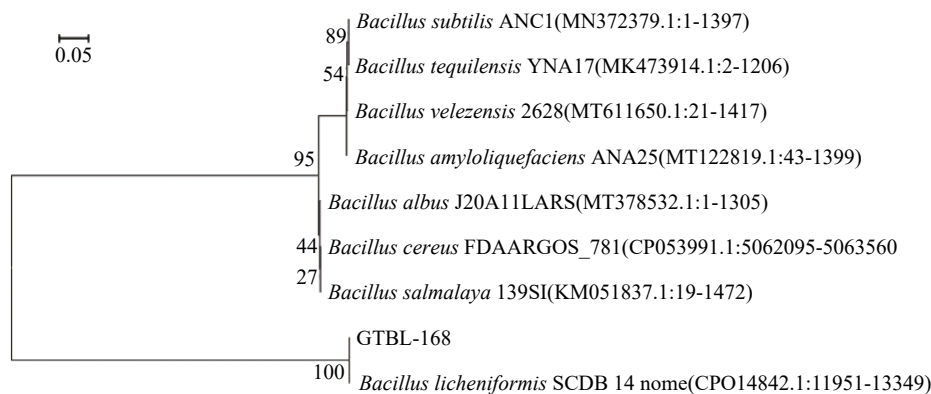


图 2 菌株 GTBL-168 16S rDNA 基因序列系统发育树

Fig.2 Phylogenetic tree of strain GTBL-168 based on the 16S rDNA gene homology

注:标尺 0.05 为遗传距离比例尺,是系统发育树中各分支长度的参照;GTBL-168 表示地衣芽孢杆菌 168 号菌株;KM051837.1:19-1472 等均为各菌株 GeneBank 登录号。

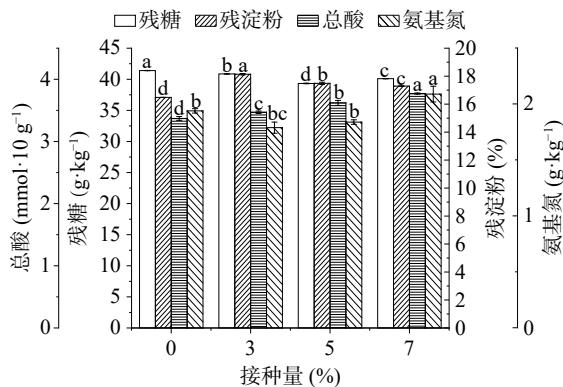


图 3 堆积糟醅中理化指标情况

Fig.3 Physical and chemical indicators in piled fermented glutinous rice

注:不同小写字母表示差异显著($P<0.05$),相同小写字母表示差异不显著($P>0.05$)。

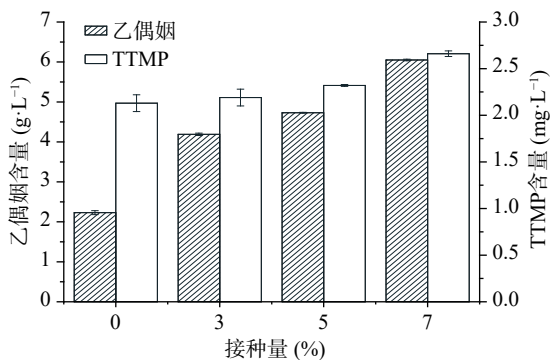


图 4 堆积糟醅中乙偶姻和 TTMP 含量

Fig.4 Content of acetoin and TTMP in the piled grains

2.5.1 堆积过程中细菌群落结构多样性分析

2.5.1.1 细菌群落测序数据统计 细菌测序结果共得到 498423 条高质量的序列,平均每个样本具有 124605 ± 7059 条序。在 OTU 聚类结果中,对样品进行 Alpha 多样性分析,可估算环境群落物种的丰度和多样性^[9]。分别用 Chao 指数和 Shannon 指数表示菌群丰富度指数和菌群多样性指数。Shannon 可估计微生物多样性,Shannon 值越大,群落多样性越高。Chao 指数是用 Chao1 算法估计群落中含 OTU 数目的指数,在生态学中常用来估计物种总数,值越大代表物种总数越多。

各堆积样本细菌群落测序数据如表 2 所示,按照相似性将得到的样品所对应的分类序列条数归类为可操作分类单元(operational taxonomic unit, OTU)。其中,接种量为 3% 的堆积糟醅中 OTU 数量最多,共 2229 个,所有样品共有的细菌 OTU 数量为 170; Chao 值代表细菌丰富度指数,Shannon 值代表细菌多样性指数,各堆积酒醅样品的 Chao1 指数在 1586.38~3107.84 之间,Shannon 指数在 5.36~6.92 之间,接种量为 3% 的堆积糟醅的 Shannon 指数最高,值为 6.92;所有样本的覆盖率(Coverage)在 0.9826~0.9926 之间,所以测序结果能够完整反映各接种量堆积糟醅样品细菌菌群组成信息。可见功能

表 2 酒醅细菌菌落测序数据统计分析

Table 2 Statistical analysis of bacteria community sequencing data of fermented grains

样品	优质序列数	OTU数	Chao指数	Shannon	Coverage
GTBL168-0%	116186	1734	2467.25	6.28	0.9873
GTBL168-3%	122683	2229	3107.84	6.92	0.9826
GTBL168-5%	126503	1092	1586.38	5.36	0.9926
GTBL168-7%	133051	1166	1934.20	5.68	0.9890

菌的添加对堆积过程细菌菌群结构有所影响。

2.5.1.2 不同接种量堆积样品细菌种群结构分析

对比不同接种量堆积糟醅中属水平下细菌群落结构组成,四个堆积糟醅中细菌属水平 TOP10 如图 5 所示,其中丰度大于 1% 的有 9 个属,包括鞘氨醇单胞菌属(*Sphingomonas*)、克罗彭斯特菌属(*Kroppenstedtia*)、芽孢杆菌属(*Bacillus*)、海洋芽孢杆菌属(*Oceanobacillus*)、枝芽孢菌属(*Virgibacillus*)、乳杆菌属(*Lactobacillus*)、气单孢菌属(*Aeromonas*)、高温放线菌属(*Thermoactinomyces*)、*Muribaculaceae* 属。其中有 4 个属丰度较高,是堆积过程的绝对优势菌属,分别是鞘氨醇单胞菌属(*Sphingomonas*)、克罗彭斯特菌属(*Kroppenstedtia*)、芽孢杆菌属(*Bacillus*)、海洋芽孢杆菌属(*Oceanobacillus*)。其中鞘氨醇单胞菌属(*Sphingomonas*)占绝对优势,相对丰度为 24.55%~37.12%,且丰度随着功能菌接种量的变化而变化。克罗彭斯特菌属(*Kroppenstedtia*)相对丰度为 18.58%~38.58%,丰度随着功能菌接种量的增加而增加,丰度从最初的 18.58% 增加至 38.58%。芽孢杆菌属(*Bacillus*)相对丰度随着功能菌接种量的增加而增加,从最初的 4.99% 增加至 12.21%。海洋芽孢杆菌属(*Oceanobacillus*)随接种量的增加先增加后减少,接种量为 3% 时丰度最大,为 6.44%。

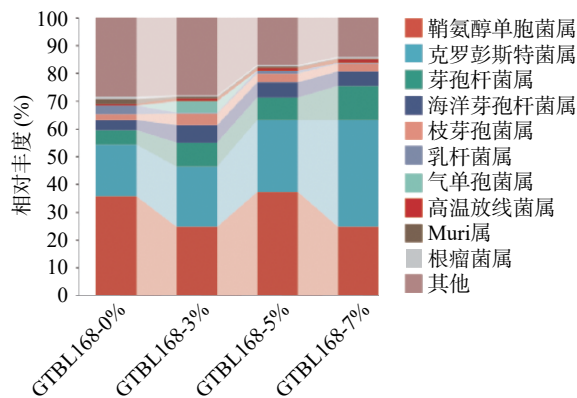


图 5 属水平下细菌群落结构组成分析

Fig.5 Distribution of bacterial community structure at genus level

注:其他为相对丰度<1%的菌门以及未得到分类学注释的 OTU 之和;图 6 同。

鞘氨醇单胞菌属(*Sphingomonas*)广泛存在于堆积酒醅中,具有较强的代谢能力,可将糖类物质转变成酸。可以推测该菌属可能是导致堆积糟醅酸含量较高的主要原因。克罗彭斯特菌属(*Kroppenstedtia*),

是高温大曲中细菌厚壁菌门(*Firmicutes*)的第 2 优势菌属,且是一种嗜热菌属^[10]。王欢等^[11]也发现其为酱香白酒机械化酿造的核心细菌属。目前在白酒中的作用尚不明确。在洋河大曲评定高通量测序中,为优等曲的优势菌属,是有益菌^[12]。袁再顺^[2]发现其与酸性蛋白酶,纤维素酶,糖化酶和液化酶的活力呈显著正相关。芽孢杆菌属(*Bacillus*)是白酒酱香味物质的主要贡献菌属,是产四甲基吡嗪的主要菌种。枯草芽孢杆菌和地衣芽孢杆菌能够产生典型的酱香味,气质分析发现这两株菌代谢产生了 5-甲基糠醛、 β -苯乙醇、苯乙酸、 α -亚麻酸等新的风味成分^[13]。一些枯草芽孢杆菌、环状芽孢杆菌等均有较强的蛋白酶和淀粉酶活力,可以降解原料中的大分子物质^[14]。其随着接种量的增加丰度不断增加,与在接种量 7% 时 TTMP 含量最高相吻合,可见其是堆积糟醅中 TTMP 的主要功能菌。海洋芽孢杆菌属(*Oceanobacillus*),主要分布于深海环境、发酵食品与发酵设备^[15]。在酱香型白酒高温大曲传统制曲和机械制曲过程中第二次翻曲阶段,该属为主要菌属,但具体功能未见报道^[16]。且该属的某些物种可以用于生产工业酶制剂,包括氧化酶、淀粉酶、过氧化氢酶、酯酶和脲酶等^[17]。

2.5.2 堆积过程中真菌群落结构多样性分析

2.5.2.1 真菌群落测序数据统计

真菌测序结果共得到 514831 条高质量的序列,平均每个样本具有 128707 ± 16879 条序列。分别用 Chao 指数和 Shannon 指数表示菌群丰富度指数和菌群多样性指数。各堆积样本真菌群落测序数据如表 3 所示,按照相似性将得到的样品所对应的分类序列条数归类为可操作分类单元(operational taxonomic unit, OTU)。其中,空白实验的堆积糟醅中 OTU 数量最多,共 104 个,所有样品共有的真菌 OTU 数量为 31; Chao 值代表真菌丰富度指数,Shannon 值代表真菌多样性指数,各堆积酒醅样品的 Chao1 指数在 71.50~118.10 之间,Shannon 指数在 1.95~2.63 之间,接种量为 7% 的堆积糟醅的 Shannon 指数最高,值为 2.63;所有样本的覆盖率(Coverage)在 0.999958~0.999984 之间,所以测序结果能够完整反映各接种量堆积糟醅样品真菌菌群组成信息。可见功能菌的添加对堆积过程真菌菌群结构有所影响。

表 3 酒醅真菌菌落测序数据统计分析

Table 3 Statistical analysis of fungal community sequencing data of fermented grains

样品	优质序列数	OTU数	Chao指数	Shannon	Coverage
GTBL168-0%	110955	104	118.10	2.20	0.999973
GTBL168-3%	125906	56	73.51	2.03	0.999975
GTBL168-5%	151643	56	71.50	1.95	0.999984
GTBL168-7%	126327	70	86.67	2.63	0.999958

2.5.2.2 不同接种量堆积样品真菌种群结构分析

对比不同接种量堆积糟醅中属水平下真菌群落结构

组成,将丰度低于 1% 的菌属合并为“其他”中显示,四个堆积糟醅中真菌属水平 TOP10 如图 6 所示,其中丰度大于 1% 的有 9 个属,主要包括红曲霉属(*Monascus*)、*Rasamsonia*、毛霉属(*Mucor*)、嗜热子囊菌属(*Thermoascus*)、曲霉属(*Aspergillus*)、嗜热真菌属(*Thermomyces*)、鸡土从菌属(*Termitomyces*)、生丝毕赤酵母属(*Hyphopichia*)。其中,有 5 个属丰度较高,是堆积过程的优势菌属,分别是红曲霉属(*Monascus*)、*Rasamsonia*、嗜热子囊菌属(*Thermoascus*)、曲霉属(*Aspergillus*)、嗜热真菌属(*Thermomyces*)。其中红曲霉属(*Monascus*)相对丰度为 4.91%~10.79%,丰度随着功能菌接种量的变化而变化。*Rasamsonia* 属相对丰度为 3.48%~7.57%,在接种量 3% 时丰度最大。嗜热子囊菌属(*Thermoascus*)相对空白来说,添加功能菌后的堆积糟醅中其相对丰度均有所增加,且接种量 3% 时丰度最大。

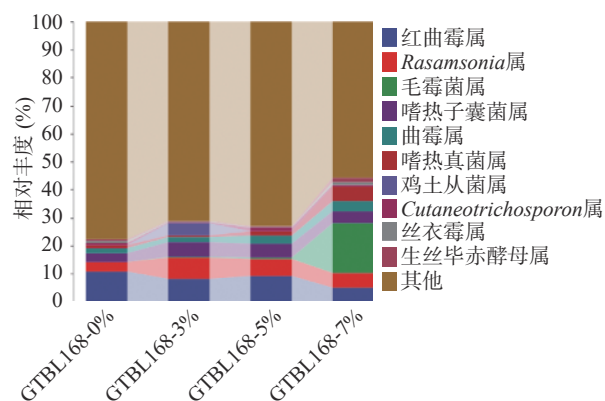


图 6 属水平下真菌群落结构组成分析

Fig.6 Distribution of fungal community structure at genus level

红曲霉属(*Monascus*),是白酒酿造过程中的重要功能菌属,有较高的糖化酶、蛋白酶等多种酶活力,同时具有较强的酯化能力,且在白酒酿造中产生丰富的香味物质,从而平衡协调口感,增强酒体的绵柔度^[18]。其也是红心曲中主要产红色素的优势菌株。固态发酵时可以产酯类物质,在酱香型白酒中发现有红曲霉的大曲是好曲^[19]。红曲霉可以产生淀粉酶、蛋白酶、纤维素酶、脂肪酶和酯酶,且具有生产红曲色素、Lovastatin、麦角固醇和乙醇的能力^[20]。芽孢杆菌的添加使红曲霉相对丰度降低,可能是由于其他菌属因氮源增加而丰度增加,但红曲霉生长较慢,从而使相对丰度减少。*Rasamsonia* 属是一种丝状真菌,在堆积糟醅及大曲的微生物多样性实验中均有发现^[21-23],目前功能尚不明确。嗜热子囊菌属(*Thermoascus*),是酱香型白酒大曲中的优势菌群^[24],能够产生热稳定的水解酶,在白酒酿造过程中能够降解原料中的淀粉或纤维素大分子物质,是重要的功能菌属^[25]。曲霉属(*Aspergillus*)也是一种丝状真菌,该菌属为酱香型白酒大曲和酒醅中的优势菌属,环境耐受性较强,可以同时分泌产生糖化酶和蛋白酶,是酱香型白酒酿造过程中的重要产酶功能菌^[26]。其可以

调控大曲和酒醅的糖化力、酯化力、液化力,并且代谢产生有机酸等,催化生成芳香脂类物质,进而改善酒体风味^[27]。嗜热真菌属(*Thermomyces*)是酱香型白酒发酵过程的优势菌属,能产生高活力且耐热的纤维素酶、蛋白酶等酶类,有利于微生物的繁殖生长代谢以及产酒生香^[16]。

3 结论与讨论

从大曲中分离出了 13 株菌,并挑选出蛋白酶透明圈 HC 值大于等于 1.3 的 5 株菌株进行液态发酵培养,结果筛选出了一株产 TTMP 含量较高的地衣芽孢杆菌 GTBL-168,其产乙偶姻含量为 17.51 g/L,产 TTMP 含量为 12.22 mg/L;结合产蛋白酶情况可以发现,高产 TTMP 的功能菌需同时具有较高的产蛋白酶和乙偶姻能力,该菌才可能代谢生成高含量的 TTMP,研究结果为进一步选育高产 TTMP 菌株提供了理论指导。

将该功能菌株的液态发酵液作为种子液添加到拌有大曲的糟醅中协同堆积培养,通过加菌组和空白组酒醅的对比,该功能芽孢杆菌提高了堆积糟醅中 TTMP 的含量,当接菌量为 7% 时增量最大,乙偶姻含量为 6.05 g/L,较对照组 2.23 g/L 增加了 171.30%,TTMP 含量为 2.66 mg/L,比对照组增加了 24.88%,可能是因为糟醅酸度较高且氮含量不足,因此乙偶姻转化合成 TTMP 效率较低,而氮含量的不足可能是因为蛋白酶活力不高导致的。如果对该菌株通过诱变等手段提高其蛋白酶活力,则可能会大幅度提高 TTMP 的产量。

功能菌的添加对堆积过程糟醅的理化性质影响较明显,氨基氮含量和总酸均有所提高,推测是氨基氮的提高促进了产酸菌的生长;堆积糟醅中除红曲霉属以外的其他优势细菌属和真菌属相对丰度均有所增加,可能是因为芽孢杆菌的添加提高了糟醅中氮源含量从而促进了其他菌属的生长,而红曲霉生长速度较慢导致相对丰度降低;且糟醅中芽孢杆菌属丰度的增加与 TTMP 含量增加相吻合。地衣芽孢杆菌 GTBL-168 的添加对白酒整体风味的影响,有待通过进一步生产试验验证。

参考文献

- [1] 董雪姣,姜伊鸣,于晓辰,等.川芎嗪衍生物及其药理活性研究进展[J].*中南药学*,2012,10(4):294-299. [DONG X J, JIANG Y M, YU W C, et al. Research progress of ligustrazine derivatives and their pharmacological activities[J]. *Zhongnan Pharmacy*, 2012, 10(4): 294-299.]
- [2] 袁再顺.“破堆移位”对酱香型白酒冬季堆积发酵的影响研究[D].贵阳:贵州大学,2019. [YUAN Z S. Study on the influence of “breaking pile displacement” on winter accumulation and fermentation of Maotai-flavor liquor[D]. Guiyang: Guizhou University, 2019.]
- [3] 袁建国,赵纪文,李峰,等.一种细菌微生物提高白酒品质的方法:中国,104250594A[P]. 2014-12-31. [YUAN J G, ZHAO J W, LI F, et al. A method for bacteria and microorganisms to improve

the quality of liquor: China, 104250594A[P]. 2014-12-31.]

- [4] 张温清.芝麻香型白酒四甲基吡嗪形成及其高产 TTMP 酿造工艺研究[D].合肥:合肥工业大学,2020. [ZHANG W Q. Study on the formation of sesame-flavored liquor tetramethylpyrazine and its high-yield TTMP brewing process[D]. Hefei: Hefei University of Technology, 2020.]
- [5] 王晓丹,雷安亮,王婧,等.产四甲基吡嗪地衣芽孢杆菌的应用[J].*中国酿造*,2017,36(2):35-38. [WANG X D, LEI A L, WANG J, et al. Application of tetramethylpyrazine-producing *Bacillus licheniformis*[J]. *China Brewing*, 2017, 36(2): 35-38.]
- [6] 安徽省质量技术监督局.固态发酵酒醅分析方法:DB 34/T 2264—2014[S].北京:国家标准化管理委员会,2014. [Quality and Technical Supervision Bureau of Anhui Province. Analysis method of solid-state fermented mash: DB 34/T 2264—2014[S]. Beijing: National Standardization Administration, 2014.]
- [7] 刘唤明,张芷欣,洪鹏志,等.耐高温蛋白酶产生菌的筛选及酶学特性的初步研究[J].*食品工业科技*,2017,38(3):133-136. [LIU H M, ZHANG Z X, HONG P Z, et al. Screening of thermostable protease-producing bacteria and preliminary study on its enzymatic characteristics[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2017, 38(3): 133-136.]
- [8] 丁雪梅.酒曲中高产四甲基吡嗪菌株的选育及发酵优化[D].天津:天津科技大学,2015. [DING X M. Breeding and fermentation optimization of high-yield tetramethylpyrazine strains in distiller's yeast[D]. Tianjin: Tianjin University of Science and Technology, 2015.]
- [9] LI B, ZHANG X, GUO F, et al. Characterization of tetracycline resistant bacterial community in saline activated sludge using batch stress incubation with high-throughput sequencing analysis[J]. *Water Research*, 2013, 47(13): 4207-4216.
- [10] 姚粟,葛媛媛,李辉,等.利用非培养技术研究芝麻香型白酒高温大曲的细菌群落多样性[J].*食品与发酵工业*,2012,38(6):1-6. [YAO S, GE Y Y, LI H, et al. Study on the bacterial community diversity of sesame-flavor liquor high temperature Daqu using non-cultivation technology[J]. *Food and Fermentation Industries*, 2012, 38(6): 1-6.]
- [11] 王欢,席德州,黄永光,等.酱香型白酒机械化酿造不同轮次堆积发酵细菌菌群结构多样性分析[J].*食品科学*,2020,41(2):188-195. [WANG H, XI D Z, HUANG Y G, et al. Diversity analysis of bacterial flora structure in different rounds of stacked fermentation for mechanized brewing of Maotai-flavor liquor[J]. *Food Science*, 2020, 41(2): 188-195.]
- [12] 苏葛,王晓慧,董大伟,等.高通量测序技术在洋河大曲质量等级判定中的应用[J].*酿酒科技*,2019(1):86-90. [SU G, WANG X H, DONG D W, et al. Application of high-throughput sequencing technology in the quality grade judgment of Yanghe Daqu[J]. *Winery Science and Technology*, 2019(1): 86-90.]
- [13] 王霜,缪礼鸿,张明春,等.浓酱兼香型酒醅中产酱香芽孢杆菌的筛选及发酵风味成分分析[J].*中国酿造*,2017,36(10):61-65. [WANG S, MIAO L H, ZHANG M C, et al. Screening of *Bacillus* soy-scented *Bacillus* from thick sauce and flavor wine grain and analysis of fermented flavor components[J]. *China Brewing*, 2017, 36(10): 61-65.]

- [14] 庄名扬,王仲文,孙达孟,等. 酱香型习酒功能菌的选育及特征组分的研究[J]. 酿酒科技, 1996(3): 13. [ZHUANG M Y, WANG Z W, SUN D M, et al. Selection of Maotai-flavored wine-producing functional bacteria and study of its characteristic components[J]. Winemaking Science and Technology, 1996(3): 13.]
- [15] YUMOTO I. *Oceanobacillus oncorhynchi* sp. nov., a halotolerant obligate alkaliphile isolated from the skin of a rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), and emended description of the genus *Oceanobacillus*[J]. International Journal of Systematic & Evolutionary Microbiology, 2005, 55(4): 1521.
- [16] 郭敏. 基于高通量测序对酱香大曲制曲微生物多样性的研究[D]. 贵阳: 贵州大学, 2018. [GUO M. Research on the micro-ecological diversity of sauce-flavored Daqu based on high-throughput sequencing[D]. Guiyang: Guizhou University, 2018.]
- [17] TOMINAGA T, AN S Y, OYAIZU H, et al. *Oceanobacillus soja* sp. nov. isolated from soy sauce production equipment in Japan[J]. Journal of General & Applied Microbiology, 2009, 55(3): 225.
- [18] 方跃进. 红曲霉在我国白酒生产中的作用[J]. 中国酿造, 2013, 32(4): 133-135. [FANG Y J. The role of monascus in the production of Chinese liquor[J]. China Brewing, 2013, 32(4): 133-135.]
- [19] 周靖, 吴天祥. 酱香大曲中红曲霉的筛选及其酶活性研究[J]. 酿酒科技, 2013(10): 24-26. [ZHOU J, WU T X. Screening of monascus from maotai-flavor daqu and study on its enzyme activity[J]. Wine Making Science and Technology, 2013(10): 24-26.]
- [20] 刘秀, 郭坤亮, 张艳梅, 等. 茅台酒曲中分离红曲霉酶系及发酵性能研究[J]. 酿酒科技, 2006(2): 31-33. [LIU X, GUO K L, ZHANG Y M, et al. Separation of monascus enzyme system from Moutai liquor koji and study on its fermentation performance[J]. Liquor Science and Technology, 2006(2): 31-33.]
- [21] 方程, 杜海, 徐岩. 大曲丝状真菌的物种多样性及其次级代谢产物的合成潜力[J]. 食品与发酵工业, 2019, 45(15): 1-8. [FANG C, DU H, XU Y. Species diversity of Daqu filamentous fungi and the synthesis potential of secondary metabolites[J]. Food and Fermentation Industries, 2019, 45(15): 1-8.]
- [22] 孙利林, 李立郎, 胡萍, 等. 酱香型白酒第四轮次酒酿造过程中真菌多样性分析[J]. 中国酿造, 2019, 38(11): 24-30. [SUN L L, LI L L, HU P, et al. Analysis of fungal diversity during the fourth round of Maotai-flavor liquor brewing[J]. China Brewing, 2019, 38(11): 24-30.]
- [23] 王彦华. 福矛窖酒酿造环境微生物区系结构分析[J]. 福州: 福建师范大学, 2016. [WANG Y H. Analysis of the microbial flora structure in the brewing environment of Fumaojiao Liquor[J]. Fuzhou: Fujian Normal University, 2016.]
- [24] 沈毅, 程伟, 邓小波, 等. 酱香高温大曲、酒醅和窖泥的真菌多样性分析[J]. 酿酒科技, 2019(3): 17-23. [SHEN Y, CHENG W, DENG X B, et al. Analysis of fungal diversity in sauce-flavored high-temperature Daqu, glutinous rice and pit mud[J]. Wine Making Science and Technology, 2019(3): 17-23.]
- [25] JAIN K K, DEY T B, KUMAR S, et al. Production of thermostable hydrolases (cellulases and xylanase) from *Thermoascus aurantiacus* RCKK: A potential fungus[J]. Bioprocess and Biosystems Engineering, 2015, 38(4): 787-796.
- [26] 黄永光. 酱香型白酒酿造中 *Aspergillus hennebergii* 及其分泌酸性蛋白酶的研究[D]. 无锡: 江南大学, 2014. [HUANG Y G. Study on *Aspergillus hennebergii* and its secretion of acid protease in the brewing of Maotai-flavor liquor[D]. Wuxi: Jiangnan University, 2014.]
- [27] DORN-IN S, HÖLZEL C S, JANKE T, et al. PCR-SSCP-based reconstruction of the original fungal flora of heat-processed meat products[J]. International Journal of Food Microbiology, 2013, 162(1): 71-81.