

川皖地区浓香型白酒窖底泥微生物菌群的多样性分析

李文芳¹, 王海英¹, 张文学^{1,2}, 邓宇³

(1.四川大学轻纺与食品学院, 四川 成都 610065; 2.四川大学锦江学院白酒学院, 四川 眉山 620860;

3.农业部沼气科学研究所, 四川 成都 610041)

摘要: 以四川中部三大名优酒厂所取 20 年窖龄的窖底泥, 以及在安徽某酒厂所取窖龄为 20 年的老熟、未老化和老化窖泥为研究对象。通过 PCR-DGGE 技术及 Quantity One 软件分析比对了各酒厂窖底泥的微生物群落结构。结果表明, 与安徽某酒厂相比, 四川 3 个酒厂的细菌群落结构极为相似, 而各酒厂古菌菌群的差异较大, 安徽某酒厂老化窖泥与其老熟及未老化窖泥相比, 细菌和古菌菌群在数量和丰度上都有所降低, 但是都有明显的优势菌存在。

关键词: 窖泥; 细菌; 古菌; 群落; DGGE

中图分类号: TS262.3; TS261.1; TS261.4 Q93-3 文献标识码: A 文章编号: 1001-9286(2013)01-0023-04

Analysis of the Diversity of Microflora in Pit Mud of Nong-flavor Liquor in Sichuan and Anhui Area

LI Wenfang¹, WANG Haiying¹, ZHANG Wenxue^{1,2} and DENG Yu³

(1.College of Light Industry, Textile & Food, Sichuan University, Chengdu, Sichuan 610065; 2. School of Liquor-Making Engineering, Jinjiang College, Sichuan University, Meishan, Sichuan 620860; 3.Biogas Institute of Ministry of Agriculture, Chengdu, Sichuan 610041, China)

Abstract: In this study, bottom pit mud with their age as 20 years from three famous distilleries in middle Sichuan, and matured pit mud, unaged and aged pit mud with their age as 20 years from a distillery in Anhui were used as the research objects. Microbial community structures of those pit mud samples were analyzed by PCR-DGGE technology and Quantity One software. The results suggested that the microbial community structures of pit mud samples from three distilleries in Sichuan were quite similar but their archaea community were different; As for pit mud samples from Anhui, the quantity and the diversity of bacterial and archaea community in aged pit mud reduced in comparison with matured pit mud and unaged pit mud, but dominant bacteria and archaea were observed clearly.

Key words: pit mud; bacteria; archaea; community; DGGE

窖泥在浓香型白酒生产中扮演了极其重要的角色, 是生产浓香型优质白酒的重要条件。窖泥中复杂的微生物群落与浓香型白酒中复杂的呈香呈味物质的形成直接相关, 与产品质量和酒体风格有着十分密切的关系^[1]。窖泥常年处于低 pH 值、高水分、高静压、兼性厌氧的窖池中, 加之酿酒发酵过程的周期性开窖和闭窖, 以及酒醅中营养成分、菌群与窖泥中营养成分、菌群的相互作用等, 给窖泥中微生物的生长、优化提供了特殊的栖息环境^[2-4]。随着窖池使用年份的延长, 窖泥逐渐趋于老熟或老化, 从而左右着传统白酒生产的质量和风格的稳定性^[5]。窖池窖泥中微生物群落结构的分析和研究对于了解窖泥质量及其对酒的香味和风味影响发挥着非常重要的作用。采用传统分离培养方法仅能在一定程度上揭示可培养微生

物的演替, 但不能全面地反映系统中真实的演替过程。近年来, 随着微生物分子生态学以及酿酒微生物生态学研究技术的发展, 研究者可以直接从分子水平上来研究环境样品中微生物区系组成和群落结构的变化^[6-8]。

本研究分别选取四川省中部三大名酒厂窖龄均为 20 年的窖底泥, 以及安徽省西北部某酒厂 20 年窖龄的老熟、未老化和老化的窖底泥, 通过 PCR-DGGE 技术对其微生物菌群进行对比研究, 以期能够揭示窖泥的地域差异、窖泥质量与窖泥中微生物菌群变化之间的关系, 从而找到延缓或预防窖泥老化的方法, 同时对弄清浓香型白酒中风味因子形成的生物学基础提供理论依据, 也为进一步分离和开发应用窖池窖泥中的微生物资源提供前期理论信息。

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(31071585)。

收稿日期: 2012-10-19

作者简介: 李文芳(1989-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 食品科学。

通讯作者: 张文学(1963-), 男, 教授, 博导, 研究方向: 发酵工程, E-mail: foodbiotech@126.com。

优先数字出版时间: 2012-12-17; 地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/52.1051.TS.20121217.1628.001.html>。

1 材料与方法

1.1 材料

样品:四川省 JC、TC 和 QC 三大名酒厂窖龄 20 年的窖底泥;安徽省西北部 XC 酒厂 20 年窖龄老熟、未老化和老化的窖底泥。取样后于 -20°C 冷冻封存。

1.2 实验方法

1.2.1 总基因组 DNA 的提取

采用直接裂解法与试剂盒相结合的方法^[9]。步骤如下:用细胞裂解液(100 mmol/L Tris-Cl, 5 mmol/L EDTA, 500 mmol/L NaCl, 1 % SDS, pH 7.5)65 $^{\circ}\text{C}$ 处理样品 30 min 后,4 $^{\circ}\text{C}$ 下以 12000 r/min 离心 10 min,收集上清 DNA。利用 DNA 提取试剂盒(上海生工)对基因组进行漂洗,洗脱,收集。置于 -20°C 保存。

1.2.2 PCR 扩增及 DGGE(变性梯度凝胶电泳)分析

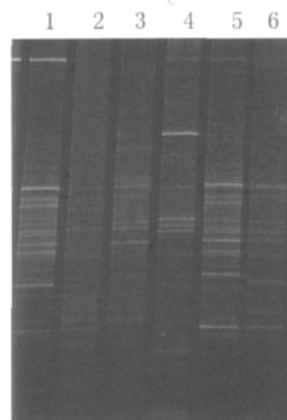
细菌使用引物 WBAC1/WBAC2-GC 对其 16S rDNA V7~V8 区进行扩增,扩增目的片段大小为 366 bp,引物序列及扩增程序已有报道^[12-13]。扩增产物经过切胶纯化以去除 PCR 过程中产生的引物二聚体等污染,所得 PCR 产物用 2 % 琼脂糖电泳检测,再通过 DGGE(Bio-Rad, USA)分析研究微生物的菌群结构。丙烯酰胺凝胶浓度为 8 %,细菌和古菌变性梯度范围分别为 30 %~55 % 和 30 %~50 %(100 % 变性剂为 7 mol/L 尿素和 40 % 去离子甲酰胺),PCR 产物上样量为 25 μL 。在 200 V、60 $^{\circ}\text{C}$ 条件下电泳 240 min。电泳完毕后,用 SYBR Green I(1 $\times$ TAE, 1:10000)染色 45 min,通过紫外成像系统捕获图像。利用分析软件(Quantity One 4.2.3, Bio-Rad)读取图谱上条带的光密度值,完成 match 比对后,采用 UPGMA 算法进行聚类分析,并生成 DGGE 图谱相似性分析图^[14]。

2 结果与分析

2.1 各酒厂窖底泥细菌 16S rDNA V7~V8 区的 DGGE 分析

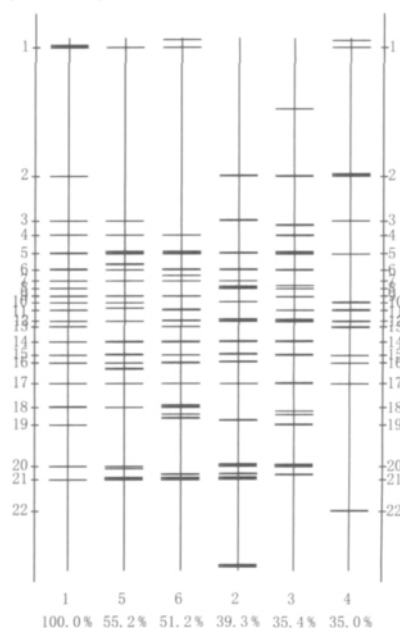
对样品中的细菌进行 16S rDNA V7~V8 区的 DGGE 分析,其结果见图 1~图 3。

结合图 1 中的 1、5 和 6 泳道以及图 2 中的泳道识别图可知,与安徽某酒厂相比,四川三大酒厂窖底泥中细菌菌群的相似性极大。JC(泳道 1)有 21 条可识别的条带, QC(泳道 5)和 TC(泳道 6)均有 20 条可识别的条带。如果每根条带代表一类菌种或菌属,那么 JC、QC 和 TC 三大酒厂窖底泥中细菌的群落结构较为相似;根据图 3 的相似性分析图也可知,四川三大酒厂聚类分析首先聚为一簇,也表明前述观点。以上结论可推测,浓香型白酒生产的重要条件——窖泥的质量与地域环境和气候等都有



1 1.JC;2.XC 老熟;3.XC 未老化;4.XC 老化;5.QC;6.TC

图 1 细菌 16S rDNA V7~V8 区的 DGGE 图

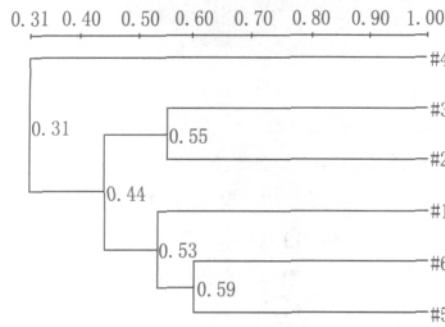


1.JC;2.XC 老熟;3.XC 未老化;4.XC 老化;5.QC;6.TC

图 2 细菌 16S rDNA V7~V8 区的泳道识别图

重要的关联。不同的地域环境造成气候以及水质等的不同都有可能影响窖泥的质量,从而影响窖泥中微生物在多样性及数量上的变化,最终影响了产品的质量。与安徽的气候条件相比,四川省常年雨水丰富,气候湿润,温度均匀,土地水分含量高,微生物的生长繁殖保存较好。

由图 1 和图 2 可看出,XC 老熟窖泥(泳道 2)、未老化窖泥(泳道 3)和老化窖泥(泳道 4)分别有可识别条带 17 条、19 条、13 条。再结合图 3 的相似性分析图可知,老熟和未老化窖泥的细菌群落结构较为相似,而老化窖泥的细菌数量和丰度均有所降低,但是有明显的优势菌存在。由此可初步分析,老化窖泥低水分、低 pH 值及营养物质缺乏等特定环境使某些细菌菌种成为优势菌而其他细菌菌种逐步衰亡或退化,这些特定细菌优势菌的出现或逐渐占优势导致窖泥的进一步老化而使其质量变差。

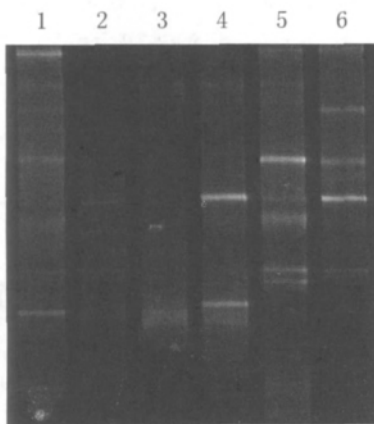


#1.JC; #2.XC老熟; #3.XC未老化; #4.XC老化; #5.QC; #6.TC

图3 细菌 16S rDNA V7~V8 区 DGGE 图谱相似性分析图

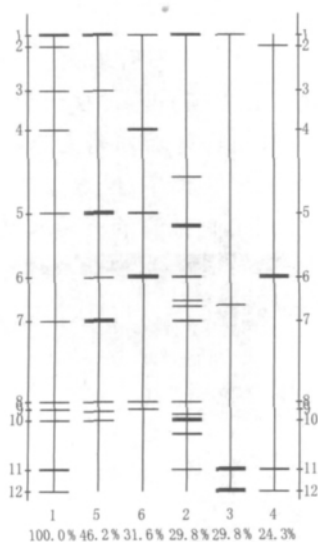
2.2 各酒厂 20 年窖龄窖底泥古菌 16S rDNA V3~V4 区的 DGGE 分析

对 20 年窖龄窖底泥中古菌进行 16S rDNA V3~V4 区的 DGGE 分析,结果见图 4~图 6。



1.JC; 2.XC老熟; 3.XC未老化; 4.XC老化; 5.QC; 6.TC

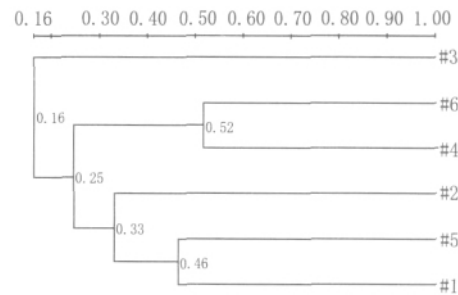
图4 古菌 16S rDNA V3~V4 区的 DGGE 图



1.JC; 2.XC老熟; 3.XC未老化; 4.XC老化; 5.QC; 6.TC

图5 古菌 16S rDNA V3~V4 区的泳道识别图

由图 4~图 6 可看出,JC 与 QC 样品中古菌的群落



#1.JC; #2.XC老熟; #3.XC未老化; #4.XC老化; #5.QC; #6.TC

图6 古菌 16S rDNA V3~V4 区 DGGE 图谱相似性分析图

结构较为相似,而 TC 样品则与 XC 老化窖泥中古菌菌群多样性更为相似,这与细菌在同一地域的相似性更高的结果不同。这可能是由于窖池随着发酵的进行和黄酒等物质的下渗以及不同气候、环境等因素的作用,使得各酒厂窖池窖底泥中都有其独特的古菌菌种,从而造成各酒厂的产品有其特有的风味及口感,此外还有可能是 TC 窖泥有可能已开始出现老化现象,需要及时进行养窖护窖。XC 老熟窖泥中古菌菌群的多样性比未老化及老化窖泥丰富得多,而与细菌结果一致的是,老化窖泥中古菌群的丰度降低,且有优势菌出现。因而同样可以初步断定,老化窖泥低水分、低 pH 值等特定环境更利于某些古菌优势菌的生存而使其他菌种衰退,而这些特定古菌优势菌的出现或逐渐占优势会导致窖泥老化。

3 讨论

窖池窖泥发酵是中国白酒生产工艺的特色之一,对窖泥中微生物群落结构的研究可为进一步正确认识白酒风味因子形成机理及控制窖池窖泥环境提供依据。本研究通过 PCR-DGGE 技术对位于四川的三大名优酒厂 JC、QC 和 TC 窖池窖底泥中的微生物菌群结构进行分析,可以得出以下结论:①与安徽酒厂相比,四川三大酒厂窖泥中细菌菌群多样性极为相似;②XC 老熟和未老化窖泥的细菌群落结构较为相似,而老化窖泥的细菌数量和丰度均有所降低,但是有明显的优势菌存在;③各酒厂古菌群落多样性的差异较大;④XC 老熟窖泥中古菌菌群的多样性比未老化及老化窖泥丰富得多,且老化窖泥中古菌菌群的丰度降低,且有优势菌存在。

综上所述,利用分子生物学方法分析白酒窖池窖泥中微生物的群落结构和亲缘关系,对深入分析窖池中微生物的分布,研究中国白酒风味因子形成机理、有效控制环境条件和实现名优白酒的异地生产有着积极的意义。虽然 16S rDNA 作为标记分子在研究环境细菌群落组成及动态变化方面有较强的优势,技术亦相对成熟,但仅仅研究 16S rDNA 序列无法揭示环境中各细菌基因组之间的真正关系,也不能得到关于菌株遗传和生理方面的信

息。对于包括浓香型白酒发酵过程中的微生物群落组成、动态变化及其与产品品质之间关系的充分解析, 还需通过建立各种功能基因和 16S rDNA 的克隆文库并充分结合纯培养技术开展系统的研究。

参考文献:

- [1] 李大和,黄圣明.浓香型曲酒生产技术[M].北京:中国轻工业出版社,1991:95-107.
- [2] 施思,王海英,张文学,等.浓香型白酒不同窖泥的微生物群落特征分析[J].酿酒科技,2011(5):38-41.
- [3] 孙景明.窖泥老化与防治[J].酿酒,2011,6(28):42-44.
- [4] 章发胜,张学英.预防酿酒窖泥老化的研究[J].酿酒,2011,6(37):45-46.
- [5] 易彬,任道群,唐玉明,等.不同窖龄窖泥微生态变化研究[J].酿酒科技,2011(6):32-34.
- [6] Ruiz A, Poblet, M Mas A, Guillaumon J M, Identification of acetic acid bacteria by RFLP of PCR-amplified 16S rDNA and 16S-23S rDNA intergenic spacer[J].International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2000(50): 1981-1987.
- [7] 唐云容,钟方达,张文学.浓香习酒窖泥微生物菌群多样性及系统发育分析[J].酿酒科技,2011(12):24-28.
- [8] 张文学,向文良.浓香型白酒窖池糟醅原核微生物区系的分类研究[J].酿酒科技,2005(7):22-26.
- [9] 黄永光,黄平,涂华彬.窖泥微生物总 NDA 的提取纯化研究[J].酿酒科技,2004(3):41-42.
- [10] 付琳琳.应用 PCR-DGGE 技术分析泡菜中乳酸菌的多样性[D].南昌:南昌大学,2005.
- [11] 王涛,田时平,赵东,等.浓香型白酒窖泥、出窖糟醅细菌区系的相似性分析[J].食品科学,2012(33):193-197.
- [12] 申卫收,尹睿,林先贵,等.绰墩山遗址古水稻土细菌与古菌群落的 PCR-DGGE 分析[J].生态学报,2008(6):2917-2899.
- [13] Watanabe K, Teramo to M, Futamata H, et al. Molecular detection, isolation, and physiological characterization of functionally dominant phenol degrading bacteria in activated sludge[J]. Appl. Environ. Microbiol. 1998, 64(11): 4396-4402.
- [14] 施思,张文学,邓宇,等.用 DGGE 技术构建白酒酿造微生物指纹图谱的初步研究[J].中国酿造,2010(1):118-120.

2012 年《中国学术期刊影响因子年报 & 国际引证报告》暨“中国最具国际影响力学术期刊”发布会在北京召开

本刊讯 2012 年 12 月 26 日,由中国学术期刊电子杂志社、中国科学文献计量评价研究中心与清华大学图书馆共同主办的《中国学术期刊影响因子年报(2012 版)》和《中国学术期刊国际引证报告(2012 版)》发布会在北京国际会议中心隆重召开,来自国家相关部门的领导、国内各期刊杂志社及各大新闻媒体等共约 2000 人参加了本次发布会,同时会议上还首次发布了 2012 年度中国最具国际影响力学术期刊和中国国际影响力优秀期刊,科技界和社科界 418 个学术期刊分别入选两个名单。

我国对于学术期刊国际影响力的评价,以往多以 SCI(科学引文索引)、SSCI(社会科学引文索引)等国际权威检索机构收录与否作为唯一衡量标准,很多未被收录期刊往往不被看好。本次发布据中国科学文献计量评价中心主任杜文涛介绍,中国最具国际影响力学术期刊和中国国际影响力优秀期刊,是依据《中国学术期刊国际引证报告(2012 版)》,按 2011 年度中国学术期刊被 SCI 期刊、SSCI 期刊引用的总被引频次和影响因子排序,经综合计算,并经 40 多位期刊界专家审议,最终遴选出的 TOP 5 %期刊和 TOP 5 %~10 %期刊。在中国最具国际影响力学术期刊中,科技期刊备选 3533 种,由上述方法选出 175 种;人文社科类备选 680 种,选出 34 种,共计 209 种。同样,在中国国际影响力优秀期刊中,由上述方法选出科技类期刊和人文社科类期刊也分别为 175 种和 34 种,共计 209 种。参与报告研制的研究人员惊喜地发现,不少非 SCI、SSCI 收录期刊比 SCI、SSCI 收录期刊具有更高的被引用次数。在上榜的 418 个期刊中,中文期刊达 312 个。

《中国学术期刊国际引证报告》的发布是我国学术期刊乃至学术评价领域的一个突破性进展,是我们国家,也是国际上第一次从文献计量的角度,全面、系统、深入地向社会揭示中国学术期刊走向世界取得的成果和存在的问题。此举标志着我国学术期刊有了统一的国际影响力认证标识。(莹子)



发布会会场