浓香型白酒不同窖泥的微生物群落特征分析

施 思[1],王海英[1],张文学[1],邓 宇[2],赖登燡[3],范 廒[3]
(1.四川大学食品工程系,四川 成都 610065;2.农业部沼气科学研究所,四川 成都 610041;
3.四川水井坊股份有限公司,四川 成都 610041)

摘 要: 窖泥是发酵过程微生物栖息的生态环境之一,不同窖泥中的微生物种群随窖泥生产利用年份和环境不同而呈现不同的多样性。本研究利用细菌 16S rDNA 的 V7～V8 区和产甲烷古菌 16S rDNA V3 区的 PCR-DGGE 技术,分析了不同窖泥的微生物群落特征;同时进行了部分细菌 16S rDNA 的 V7～V8 区的序列测定。结果表明,不同窖龄及不同颜色的窖泥表征出特异性的细菌与产甲烷古菌群落发育状况;UPGAMA 聚类分析显示 50 年和 150 年黑色窖泥的菌群结构最为相似;序列分析表明 DGGE 图谱中部分条带的基因序列与基因库相似菌的相似性在 82 %～99 %之间,其中梭菌属和未被鉴定的细菌是这些窖泥样品的优势菌。

关键词: 微生物; 窖泥; 细菌; 产甲烷古菌; DGGE
中图分类号: Q93-3;TS262.31;TS261.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-9286(2011)05-0038-04

Analysis of Microbial Communities Characteristics in Different Pit Mud of Luzhou-flavor Liquor

SHI Si[1], WANG Haiying[1], ZHANG Wenxue[1], DENG Yu[2], LAI Dengyi[3] and FAN Ao[3]
(1.Food Engineering Department of Sichuan University, Chengdu, Sichuan 610065; 2. Biogas Research Institute, Ministry of Agriculture, Chengdu, Sichuan 610041; 3.Sichuan Shuijingfang Liquor Co.Ltd., Chengdu, Sichuan 610041, China)

Abstract: Pit mud is one of the habitats for microbes in the fermentation. Microbial populations in different pit mud present different characteristics due to the difference in use age and environments. In this study, PCR-DGGE of V7-V8 regions of bacteria 16S rDNA and V3 region of methanogenic archaeal 16S rDNA was employed to analyze microbial communities features in different pit mud and to finish sequencing V7-V8 regions of some bacteria. The results showed that pit mud of different age and color would induce specific communities development of bacteria and methanogenic archaea. UPGAMA cluster analysis showed that the communities structure of black pit mud with its age of 50 years and of 150 years had the highest similarity. Sequencing analysis indicated that a part of gene sequences in DGGE showed similarity in a range of 82 %～99 % with that in gene database. And clostridium and the unidentified bacteria were dominant bacteria in these pit mud samples.

Key words: microbe; pit mud; bacteria; methanogenic archaea; DGGE

窖泥在浓香型白酒生产中扮演了极其重要的角色。窖泥常年处于低 pH、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、菌群的相互作用和相互交换等作用,给窖泥微生物的生长、优化提供了特殊的栖息环境。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质量和风格的稳定性。尽管老熟窖泥被看作浓香白酒生产的命根子,但在窖泥质量的评判标准上,一些学者已从窖泥外观及理化指标上作过一些探讨,但尚不全面[1-2];微生物研究多局限于芽孢杆菌、产甲烷菌、己酸菌、丁酸菌等菌种的驯化培养研究报道,未见对窖泥质量判断有指针性意义的微生物检测指标[3-4]。同时,借助常规微生物分离培养和分类鉴定方法,对窖泥微生物的菌群构成、分布及功能性的系统探讨,显得收效甚微。

以前的研究者通过化学分析及传统微生物学方法探讨过窖泥微生态的一些特征与基酒质量的关系,普遍认为窖泥随着窖龄的增加会逐渐变好,但研究对象多限于小于 50 年的低龄窖泥[5-6]。由于发酵过程中黄水的下渗作用,窖底泥相对于窖壁泥受发酵过程的影响更全面,因而本课题选取了 20 年、50 年以及有着明显颜色差异的 2 口百年老窖的窖底泥进行微生物群落特征研究,利用

基金项目:国家自然科学基金资助项目(31071585)。
收稿日期:2011-03-02
作者简介:施思(1986-),女,在读硕士,研究方向:食品生物技术。
通讯作者:张文学,男,教授,博导,研究方向:发酵工程,E-mail: foodbiotech@126.com。

© 1994-2012 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

PCR-DGGE 技术及生物信息软件分析了细菌及古菌群落的特征与分布，希望补充和开辟窖泥微生态研究新内容。一方面,可以了解窖泥微生物菌群的基本构成及丰度变化趋势，弄清浓香型白酒发酵窖泥微生物多样性的构成差异与不同窖龄及不同质量性状窖泥的相关关系;另一方面，研究结果可为窖泥质量标准的探讨提供一些参考数据和新的思路。希望通过抛砖引玉,为提升中国传统白酒学术研究水平，继承和发展中国传统白酒的发酵工艺，提高中国传统白酒优质酒生产能力等起到积极的推动作用。

1　材料与方法

1.1　窖泥样品

全兴水井坊优质窖泥,分别为窖龄 20 年的黑色窖底泥、50 年黑色窖底泥、150 年黑色窖底泥以及 150 年窖池浅黄色窖底泥。取样后冷冻封存,尽快提取总 DNA。

1.2　主要试剂

引物 WBCA1、WBAC2-GC;SAf、PARCH519r(上海生工)、2×Taq PCR MasterMix （北京天根）、DGGE 相关试剂均为进口。

1.3　总 DNA 提取及 PCR 扩增

窖泥总 DNA 的提取参考文献[7]。细菌的扩增区为 16S rDNA V7～V8 区,长度为 366 bp,引物及相关扩增过程参考文献[8]。产甲烷古菌特异性扩增区为 16S rDNA V3 区,长度为 157 bp,引物及扩增过程参考文献[9]。

1.4　PCR 产物的变性梯度凝胶电泳及分析

PCR 扩增片段通过 DGGE (Bio-Rad,USA) 分析研究微生物群落。丙烯酰胺凝胶浓度为 8 %,变性梯度范围为 30 %～60 %(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 50 μL。在 200 V、60 ℃条件下电泳 240 min。电泳完毕用 SYBR green I (1× TAE, 1:10000) 染色 45 min，通过紫外成像系统捕获图像。最后利用分析软件 (Quantity One4.2.3,Bio-Rad, USA)读取图谱上条带的光密度值。完成 match 比对,聚类分析采用未加权算术平均组对法 (Unweighted pair group with mathematical averages, UPGAMA)。

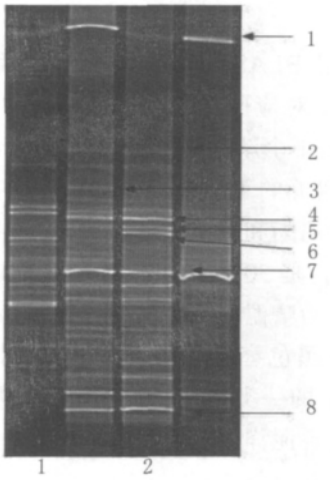
1.5　DGGE 图谱中主要条带的测序比对

DGGE 条带回收步骤参考文献[10]。回收 DNA 经二次 PCR 后直接送交上海生工测序。目的序列向日本 DDBJ 数据库进行提交。

2　结果与分析

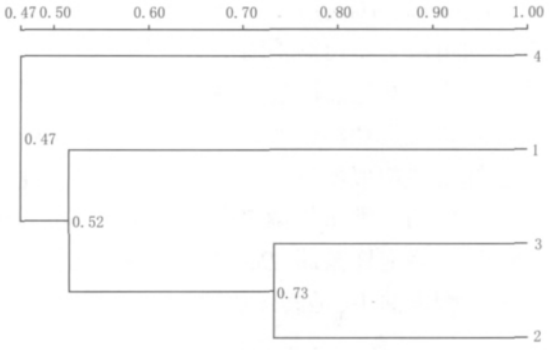
2.1　细菌 16S rDNA V7～V8 区的 PCR 扩增产物的 DGGE

细菌特异性 PCR-DGGE 图谱及其聚类树状图见图 1 和图 2。应用 Quantity One 软件共检测到 23 个条带类型。



注:图 1 为窖底泥细菌 16S rDNA V7～V8 区 DGGE 结构图谱。

图 1　细菌特异性 PCR-DGGE 图



注:图 2 为样品系统发育图(1、20 年;2、50 年;3、150 年[黑色];4、150 年[浅黄色])。

图 2　细菌特异性聚类树状图

从图 1 和图 2 整体来看,4 个样品既有共有的条带类型(如 band1),也有各自特异性的条带,如 50 年窖底泥(泳道 2)中的 band3,150 年黑色窖底泥(泳道 3)中 band6。泳道 2(50 年窖底泥)的细菌菌群多样性最为丰富,其次为泳道 3(150 年黑色窖底泥)。两者菌群结构相似度最高,在聚类分析中聚为一簇。band2、band4、band5、band7 和 band8 所代表的菌群是 50 年及 150 年黑色窖底泥中相同的优势菌群。泳道 4(150 年黄色窖底泥)的条带较为单一,细菌菌群结构比较简单,与其他 3 个黑色窖泥样品的相似性距离最远。如按每种条带类型代表一个菌属或菌种考虑,那 DGGE 的结果表明,窖泥窖龄的改变以及人工养护等因素可以形成特异性的细菌菌群发育及菌群分布。随着窖龄的增长及颜色由黄变黑过程的进行,细菌菌群逐渐丰富,优势菌群逐渐稳定,在窖龄越高的窖泥如百年老窖中,细菌活性会慢慢降低,但在优良的窖池窖泥养护下，其优势菌群以及细菌菌群丰度仍可维

© 1994-2012 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

持正常的老熟特征。

2.2 细菌 16S rDNA V7～V8 区 DGGE 主要条带测序结果

序列结果经 BLAST 比对后，获取的系统发育信息见表 1。条带 1 对应的菌株为 4 个样品共有，推测是 *Clostridium* 下的 1 个新种。一般认为，*Clostridium* 包括一些难于或不能培养的丁酸菌、己酸菌等，在窖泥中与甲烷菌共生，与丁酸乙酯和己酸乙酯有关[11]。条带 2 代表的为 *Petrimonas* 菌属，是 50 年与 150 年黑色窖泥中所特有的一类菌群，一般为嗜温的专性厌氧发酵细菌。条带 3 所代表菌群为 50 年黑色窖底泥所特有的，应该也是梭菌属(*Clostridium*)下的一类细菌，似乎可以根据其特异性备选为 50 年左右窖泥样品的特征指示菌。条带 4 和条带 8 光密度值较高，应该是 50 年与 150 年黑色窖泥所共有的一类较为优势的菌群。所对应的菌群分别是分类信息比较缺乏的未能培养的细菌(*Uncultured bacterium*)以及放线细菌属(*actinobacterium*)下的一类细菌。条带 8 对应的菌群在其他四川浓香型白酒糟醅中有过检测报道，这也可以间接说明密闭窖池发酵过程中，各微生物区系进行着菌群相互迁移及交替演化的动态平衡过程。条带 6 和条带 7 与已知菌株相似度较低，分类信息缺乏，因此它们代表的是窖泥中的一类未知菌群。条带 5 代表的是 *Firmicutes* 细菌目，芽孢杆菌属(*Bacillus*)为其代表属，一般常分离于浓香型大曲中，是其优势菌。

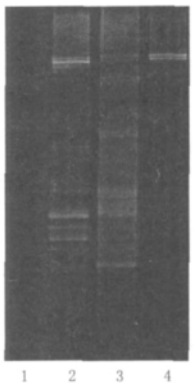
表 1 条带测序结果

序号	登录号	相似菌株	相似菌株登录号	相似度(%)
1	AB608250	*Clostridium sp.*	AF191232	94
2	AB608251	Uncultured *Petrimonas sp.*	GU583827	99
3	AB608253	Uncultured *bacterium*	GU907817	97
		Clostridium ljungdahlii	GU139551	96
4	AB608254	Uncultured *bacterium*	HM218859	98
5	AB608255	Uncultured *Firmicutes bacterium*	CU925657	99
6	AB608256	Uncultured *Firmicutes bacterium*	CU922741	92
7	AB608257	Uncultured *compost bacterium*	FN667143	82
8	AB608258	Uncultured *actinobacterium*	FJ517033	97

2.3 产甲烷古菌 16S rDNA V3 区的 PCR 扩增产物的 DGGE

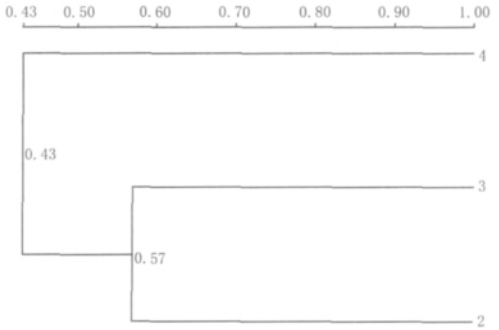
产甲烷古菌特异性 PCR-DGGE 图谱及其聚类树状图见图 3 和图 4。同细菌菌群分析结果相似，窖泥窖龄的改变以及人工养护等因素同样可以形成特异性的产甲烷古菌菌群发育及菌群分布。

从图 3DGGE 图谱中可以看出，20 年窖底泥中产甲烷古菌菌群含量极少，几乎没有检测。另外 3 个样品具有共同的产甲烷古菌菌群，但 50 年和 150 年黑色窖泥中古菌菌群结构较为接近，并且多样性十分丰富，在样品聚类



注：图 3 为窖底泥产甲烷古菌 16S rDNA V3 区 DGGE 结构图谱。

图 3 甲烷古菌 DGGE 结构图



注：图 4 为样品系统发育图(1、20 年；2、50 年；3、150 年[黑色]；4、150 年[浅黄色])。

图 4 甲烷古菌系统发育图

分析中同对应的细菌菌群一样聚为一簇。这种结果表明不同窖底泥中存在的古菌菌群演替特征与相应细菌菌群演替特征极为类似，说明窖底泥中细菌与古菌的关系十分密切。一般认为，这两者之间具有互惠共生关系，典型的例子就是甲烷菌与己酸菌的共酵作用。本研究中细菌及产甲烷古菌菌群的分布特征再次证明了这一点。

3 讨论

中国具有悠久的酒文化历史，探讨浓香型白酒窖池中不同性状的窖泥与微生物菌群多样性的关系，一方面可以了解不同窖龄的窖池中发酵活动对微生物多样性的影响，另一方面也可以为窖泥质量性状的判定及利用等提供微生物学依据。

根据一般生产经验，典型的浓香型酒窖池中窖泥的演变规律为，随着窖泥窖龄的增长，窖泥颜色由黄变黑至乌黑，气味由带有较重的硫化氢气味到有少量酒香至浓郁酒香。这是由于酿酒发酵过程中产生的有机酸类和醇类等物质通过黄水渗入窖底泥中，逐渐富集并越来越多地聚积相关代谢菌群，这些菌群的繁衍与代谢产物的积累，逐渐赋予了窖泥老熟的特征。本研究通过 DGGE 指纹图谱提供了进一步的证据：在具有自然老熟特征的黑

© 1994-2012 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

色窖底泥中，细菌及产甲烷古菌菌群随着每一次发酵的进行，其微生物区系趋于稳定及丰富。这种规律体现在50年和150年黑色窖底泥中，两者之间的细菌及古菌微生物区系都非常庞大，拥有其他2个样品所没有的菌群，并且相似度最高。而窖泥理化性质的差异也能在某种程度上说明其中微生物多样性的不同。在2口百年老窖内，通过人工养护加入鲜窖泥的黄色窖底泥中的微生物群落结构明显不同于具有老熟性质的黑色窖底泥，这也说明了窖泥化学生态特征与微生物群落多样性之间紧密关系。另外，从DGGE图谱分析情况来看，50年和150年黑色窖泥中细菌与古菌菌群的演替及分布特征非常相近。如果从窖泥化学特征和生物特征相互作用与影响的关系来看，初步推测50年左右可能是窖池微生态发生较大变化的一个分界线。

由于窖池底部在发酵过程中长期处于低氧甚至无氧状态，因此常规微生物分离检测其微生物区系构成在培养过程中显得较为困难。细菌16S rDNA V7～V8区DGGE主要条带测序结果显示了各窖底泥中有部分细菌菌群与已知菌株的最高相似度仅为97 %，最低的仅有82 %，且大多为未能或难于培养。因此，开发新型培养基获得纯培养物对功能菌的筛选纯化和新型菌株的鉴定分类都具有重要意义。除此之外，通过DGGE分离得到的核酸片断除了可以鉴定菌属还可以设计相关菌株探针，为快速检测样品特征指示菌提供模板信息。

综上所述，利用PCR–DGGE技术研究窖泥环境微生物多样性，克服了常规平板培养方法的一些缺点，在分析复杂微生态演替规律的研究中具有巨大的应用价值。但对于窖泥等复杂微生态的研究，其微生物的真实情况仍然有待通过引物设计、电泳技术及菌群定量分析等环节的进一步完善来反映。因此，通过DGGE免培养技术对窖泥微生物群落特征进行初步分析，定性描述菌群组成，寻求相关优势菌和特征指示菌，进而通过纯培养等研究手段获得相关菌株，才能更好地揭示窖泥性状特征及功能，为窖泥质量标准的建立奠定理论和技术基础。

参考文献：

[1] 李家明, 李家顺. 人工窖泥质量标准的研究与应用[J]. 酿酒科技, 1994(4)：28–31.

[2] 张良, 沈才洪, 张宿义, 等. 解析窖泥功能菌代谢能力的调控[J]. 酿酒, 2008(1)：57–61.

[3] 张文学, 乔宗伟, 向文良, 等. 中国浓香型白酒窖池微生态研究进展[J]. 酿酒, 2004，31 (2)：31–35.

[4] 杨鹏举. 窖泥中微生物菌群及其代谢模式[J]. 酿酒科技, 1995(2)：14–15.

[5] 向祖祥, 刘明, 陈明学, 等. 浓香型白酒窖泥与土壤几种理化指标的对比分析[J]. 酿酒科技, 2009(5)：81–83.

[6] 余有贵, 李侦, 熊翔, 等. 窖池微生态的主要特征研究[J]. 食品科学, 2009, 30 (21)：258–261.

[7] 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.

[8] 付琳琳. 应用PCR–DGGE技术分析泡菜中乳酸菌的多样性[D]. 武汉：南昌大学, 2005.

[9] 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.

[10] WANG GH, JIN J, LIU JJ, et al. Bacterial community structure in a mollisol under long-term nature restoration, cropping, and bare fallow history estimated by PCR–DGGE[J]. Soil Science Society of China, 2009，19(2)：156–165.

[11] 张文学，乔宗伟，胡承，等. PCR技术对浓香型白酒糟醅细菌菌群的解析[J].四川大学学报(工程科学版), 2005,37(5)：82–87.

(上接第37页)

窖底泥对下层糟醅产香的影响的研究比较多，而将浓香型酒的老窖泥或者人工窖泥用作酱香型酒窖底的窖泥，以提高产香效果，使窖底香与酱香结合，成为一种复合香，也值得研究和探讨的。

特别感谢：曾蔺，师远均提供实验帮助。

参考文献：

[1] 沈怡方.白酒生产技术大全[M].北京：中国轻工业出版社，1998.

[2] 李大和.白酒酿造工教程[M].北京：中国轻工业出版社,2006.

[3] 周恒刚.酱香型白酒生产工艺的堆积[J].酿酒科技，1999(1)：15–17.

[4] 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.

[5] 刘晓光，谢和，等.酱香型风味物质的形成与微生物关系的研究现状与进展[J].贵州农业科学，2007，35(2)：131–134.

[6] 崔利.褐变反应与酱香型白酒(上)[J].酿酒科技，2007(7)：54–56.

[7] 熊子书.中国三大香型白酒的研究(二)酱香·茅台篇[J].酿酒科技，2005(4)：25–27.

[8] 唐玉明，姚万春，任道群，等.酱香型白酒窖内发酵过程中糟醅的微生物分析[J].酿酒科技，2007(12)：50–53.

[9] 崔利.形成酱香型酒风格质量的关键工艺是“四高两长，一大一多”[J].酿酒，2007，155(5)：54–56.

[10] 李长江，张洪远，赵新，等.武陵酒生产工艺创新剖析[J].酿酒科技，2009(1)：89–91.

[11] 张守财.堆积发酵对酱香型白酒风味形成的作用及其控制[J].福建轻纺，2006(11)：17–18.

© 1994-2012 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net