

浓香习酒窖泥微生物菌群多样性及系统发育分析

唐云容^{1,2} 钟方达¹ 张文学²

(1. 贵州茅台酒厂(集团)习酒有限责任公司, 贵州 习水 564622; 2. 四川大学轻纺与食品学院, 四川 成都 610065)

摘要: 窖池窖泥中微生物的分类鉴定对于分析窖泥的时间长短及其对酒的香味和风味影响发挥着非常重要的作用。运用多种微生物分子生态学技术手段对习酒浓香窖泥细菌进行研究分析, 结果表明, 夏季老窖多粮窖泥中的细菌主要分为 4 个菌群: *Petrimonas sulfuriphila*, *Thermacetogenium phaeum*, *Caloramator* 及不可培养的杆菌属; 古菌主要分为 2 个簇: *Methanoculleus* 和 *Methanoculleus palmolei*。所有细菌都是厌氧的且大多数是嗜热或嗜温的, 窖泥中细菌和古菌共同作用生成多种活性物质降解复杂的有机物, 其代谢产物在窖池特定的环境中通过复杂的生理生化反应能形成浓香型白酒的特征风味因子。

关键词: 浓香型习酒; 窖泥; 细菌菌群; 古菌菌群; 多样性; 系统发育

中图分类号: Q93-3; TS262.31; TS261.4; TS261.1 文献标识码: A 文章编号: 1001-9286(2011)12-0024-05

Analysis of the Diversity and System Development of Bacterial Flora in Luzhou-flavor Xijiu Pit Mud

TANG Yunrong^{1,2}, ZHONG Fangda¹ and ZHANG Wenxue²

(1. Xijiu Distillery Co.Ltd. of Guizhou Maotai Distillery Group, Xishui, Guizhou 564622; 2. Textile and Food Science College of Sichuan University, Chengdu, Sichuan 610065, China)

Abstract: The classification and the identification of microbes in pit mud plays important roles in analyzing pit mud history and evaluating liquor aroma and liquor flavor. Various microbial molecular biology techniques were used to analyze microbes in Xijiu pits. The results showed that bacteria in Xijiu multiple-grains aged pit mud in summer were mainly divided into four bacteria groups including *Petrimonas sulfuriphila*, *Thermacetogenium phaeum*, *Caloramator*, and uncultured bacilli; archaea flora were mainly divided into *Methanoculleus* and *Methanoculleus palmolei*; all bacteria were anaerobic and most of them were thermophilic and mesophilic; the combined action between bacteria and archaea in pit mud finally formed various bioactive substances to degrade complex organic substances and their metabolites in the specific environments in pits through complex physiological and biochemical reactions further formed the characteristic flavoring components of Luzhou-flavor liquor.

Key words: Luzhou-flavor Xijiu liquor; pit mud; bacterial flora; archaea flora; diversity; system development

浓香型白酒的生产以窖池为基础, 发酵过程是栖息于窖池糟醅、窖泥中的庞大微生物群系在糟醅固、液、气三相界面中所形成的复杂的物质、能量代谢和信息传递过程^[1]。浓香型白酒窖池菌种资源丰富, 窖池内存在的各种类型微生物可以充分得以利用, 许多学者采用分离培养方法对窖泥中的微生物进行了分离培养, 取得了较大的进展。然而, 由于环境中可分离培养的微生物仅占环境微生物的极少数^[2-4], 大量的微生物不能培养或现阶段难于培养。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, 不能全面的反映系统当中真实的演替过程。近年来, 随着微生物分子生态学技术的发展, 人们可以避开纯培养, 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^[5]。

2005 年, 张文学和向文良等人成功利用 16S rRNA 技术对浓香型白酒糟醅发酵过程中微生物群落的演替进行了解析, 开创了分子生物学在传统酿造生物制品中应用的先河^[6]。随后许多研究者将分子生物技术应用用于发酵食品研究, 然而, 利用此方法对浓香型白酒窖池窖泥中微生物的系统研究还鲜有报道。因此, 本研究借助于 16S rRNA 分析技术全面解析窖泥中原核和真核微生物的区系构成及系统发育^[7], 弄清浓香型风味因子形成的群落水平上生物学基础, 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科学调查信息。

基金项目: 贵州白酒(非酱香型)关键共性技术研究集成与应用, 黔科合重大专项字[2010]6004 号资助。

收稿日期: 2011-10-25

作者简介: 唐云容(1976-), 女, 在读硕士, 研究方向为食品发酵及酿造技术, 发表论文数篇。

优先数字出版时间: 2011-11-10; 地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/52.1051.TS.20111110.0924.002.html?uid=>。

1 材料与方法

1.1 主要材料

1.1.1 样品的采集

来自浓香型习酒窖池中的样品:新窖多粮窖皮泥、新窖单粮窖皮泥、老窖多粮窖皮泥、老窖单粮窖皮泥、新窖单粮窖壁泥、新窖多粮窖壁泥、老窖多粮窖壁泥、老窖单粮窖壁泥共8个样品。取样时每个样品分不同部位进行无菌采集,并将外层的黑色窖泥和内层的黄色窖泥混合均匀。

1.1.2 菌种的分离

每种样品分别取10 g,加入约1倍的PBS缓冲液,用涡旋振荡器均匀振荡5 min,3000 r/min离心5 min,取上清液,10000 r/min离心2 min,弃上清液。沉淀重复洗涤2次,收集菌体备用。

1.1.3 实验设备

电炉、电磁炉、蒸锅、托盘天平、发酵罐、电热恒温隔水式培养箱(黄石市)。

高速离心机(Anke TGL-16G,上海),离心机(TDL-40B),自动台式灭菌器(TM-Q-R-325,山东),电泳仪(DYY-6C,北京),旋涡混匀器(XH-B,江苏),恒温水浴锅(DK-8D,上海),微量移液枪(Eppendorf,Germany),PCR自动扩增仪(Mastecycler gradient,Eppendorf,Germany)。

1.2 实验方法

1.2.1 16S rRNA 及 18S rRNA 基因序列分析

16S rRNA为原核生物核糖体中的一种核糖体RNA,片段大小约1.5 kb,由多个臂环组成,部分碱基配对,其余形成环,并且可划分成4个结构域,其序列具有高度的保守性,有“细菌化石”之称^[8]。

16S rRNA基因序列分析,主要是在已建立的16S rRNA基因序列数据库的基础上,用确定细菌的系统发育来判断其物种间进化关系。研究者可通过比较16S rRNA基因的序列,确定新的菌株在进化过程中的地位,并使序列探针能够识别未知菌^[9]。

1.2.2 PCR-DGGE 技术

DGGE(denaturing gradient gel electrophoresis)变性梯度凝胶电泳技术是由Fischer和Lerman于1979年最早提出的用于检测DNA突变的一种电泳技术^[10]。它的分辨精度比琼脂糖电泳和聚丙烯酰胺凝胶电泳更高,在条件完善的情况下可以检测到一个核苷酸水平的差异^[11]。

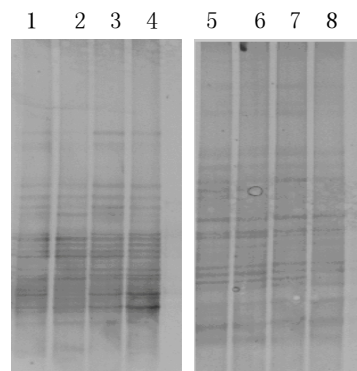
由于DGGE具有重现性高、方便快捷、可靠性强等优点,在短短的十年间,DGGE已经成为分析微生物群落遗传多样性和动态分析的常用手段,并被广泛用于环境样品中的微生物种群演替和多样性检测的研究^[12]。

2 结果与分析

2.1 窖泥细菌菌群比较分析

2.1.1 窖泥细菌菌群 DGGE 图谱比较分析

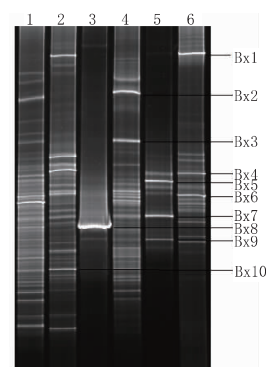
对窖泥中的细菌菌群进行DGGE比较分析,其DGGE图谱见图1、图2。



注:1.新窖单粮窖皮泥;2.新窖多粮窖皮泥;3.老窖单粮窖皮泥;4.老窖多粮窖皮泥;5.新窖单粮窖壁泥;6.新窖多粮窖壁泥;7.老窖单粮窖壁泥;8.老窖多粮窖壁泥。

图1 夏季窖泥细菌 DGGE 图谱

从图1中可以看出,在细菌层面上,单粮、多粮几乎无差别,老窖、新窖差别小,窖皮与窖壁差别较大。



注:1.多粮窖底泥;2.多粮窖壁泥;3.多粮窖皮泥;4.单粮窖底泥;5.单粮窖壁泥;6.单粮窖皮泥。

图2 冬季窖泥细菌菌群 DGGE 结构图谱

从图2可以看出,窖泥样品1(多粮窖底泥)、2(多粮窖壁泥)和4(单粮窖底泥)的细菌群落结构多样性较为丰富,大约有30类的条带类型。另外,样品6(单粮窖皮泥),条带类型数约为25类,而样品5(单粮窖壁泥)和3(多粮窖皮泥)的细菌多样性最低,条带类型仅约10类。在每一次泥窖固态发酵过程中,窖泥微环境和窖池微生态环境中的各类微生物都会进行一次动态平衡过程,窖池微生物在糟醅发酵微环境中相互迁徙和交替演变,随着窖龄的增长,微生物在种群及数量上不断丰富,窖泥微生物区系也越庞大。同时,窖池随着发酵的进行和每一次黄水等物质的下渗,使窖底环境比窖皮和窖壁环境更全

面地接受发酵过程变化的影响,因此,窖池越靠底部,其微生物区系也就会更加稳定和丰富。四川理工学院甄攀等通过 PCR-SSCP(单链构象多态性)对泸州老窖不同窖龄窖池的窖壁上层、下层和窖底泥的微生物菌群结构进行分析,结果表明,不同窖龄中相同位置的多样性指数随着窖龄的增加均呈现递增趋势。而同一口窖内不同位置的多样性指数变化规律,总体上是窖壁上层和窖底样品高于窖壁下层。而习酒 2 口窖池建窖时间并不长久,窖泥微生物还处于不断驯化和适应的过程中,其中多粮窖池内的细菌微生物区系显然还处于缓慢的迁徙过程中。

2.1.2 DGGE 主要条带序列结果分析

对 DGGE 分析结果中的主要条带序列进行分析,结果见表 1。

表 1 DGGE 图谱中条带的序列比对分析

条带号	最高相似菌株	相似菌株 登录号	相似度 (%)
Bx1	Uncultured bacterium	AB608250	99
Bx2	Uncultured <i>Clostridium</i> sp.	EU073770	99
Bx3	<i>Clostridium</i> sp. Iso-A7	DQ677011	99
Bx4	<i>Lactobacillus acetotolerans</i>	FR683099	99
Bx5	<i>Bacillus cereus</i> strain PPI3	EF407819	99
Bx6	<i>Pseudomonas</i> sp. NRS204	AJ512404	99
Bx7	<i>Bacillus licheniformis</i> strain CICC 10084	AY871103	100
Bx8	<i>Rhodococcus</i> sp. RE 59	FR749842	98
Bx9	Uncultured bacterium	AB175376	99
Bx10	Uncultured bacterium	AF429209	97

由表 1 可知,条带 Bx1、Bx9 和 Bx10 所代表的菌株为免培养菌,分类信息缺乏,需要在后续的系统发育中作进一步分析。在两类窖池的窖底泥中都被检测到的条带为 Bx2 和 Bx3,与梭菌属细菌(*Clostridium* sp.)具有 99% 的相似性。条带 Bx5 和 Bx7 同属芽孢杆菌属,分别与其蜡样芽孢杆菌(*Bacillus cereus*)和地衣芽孢杆菌(*Bacillus licheniformis*)有 99% 和 100% 的相似性。Bx4 条带序列所代表的菌属与耐酸乳杆菌(*Lactobacillus acetotolerans*)相似度达 99%,假单胞菌属(*Pseudomonas* sp.)与 Bx6 条带序列相似性也具有 99% 的相似度,而多粮窖皮泥中唯一的优势条带 Bx8 与红球菌属(*Rhodococcus* sp.)只有 98% 的相似性。

从 DGGE 图谱中可以看出,梭菌属细菌(*Clostridium* sp.)主要存在于窖底泥中,常被报道其在窖泥中与甲烷菌共生,是一类厌氧菌,多数难培养或者不能培养,这与吴衍庸在中国泸州酒窖窖泥中的研究结果一致。梭状芽孢杆菌是泸州老窖窖泥中的优势微生物,梭菌属包括一些产己酸菌和产丁酸菌等,它们能够分解淀粉、纤维素、蛋白质等物质生成己酸、丁酸、甲酸、乙酸和乳酸等,并与乙

醇反应形成相应的乙型酯。实验检测到蜡样芽孢杆菌(Bx5)和地衣芽孢杆菌(Bx6)存在于多数窖泥样品中,其在单粮窖壁泥中处于优势。该类菌群能够水解淀粉和蛋白质等大分子物质,并能利用糟醅浸入到窖泥中的营养物质产生己酸和丁酸等有机酸,有的还能形成双乙酰等芳香成分,是重要的产香和产酸菌。另外,实验还得出耐酸乳杆菌主要存在于多粮及单粮窖壁和单粮窖皮环境中,该菌群具有耐酸性,能产生大量乳酸,推测其在维持窖池酸度、抑制杂菌生长和乳酸乙酯的形成等过程中扮演着重要角色。同时,检测到的假单胞菌属及红球菌属细菌在对应的窖皮泥中为优势菌,通常窖皮泥在窖池发酵过程中起着隔绝氧气的作用,而其中的微生物代谢活动对发酵的影响还有待进一步探讨。

2.1.3 窖泥中免培养菌群系统发育分析

为了探讨免培养菌群在微生物系统中的发育地位,了解免培养菌的进化信息,通过生物信息学软件 DNAMAN,将 DGGE 图谱中 3 条分类信息较为缺乏的条带序列与相关酿造环境中常见细菌进行比对,构建了细菌菌群的系统发育树,结果见图 3。

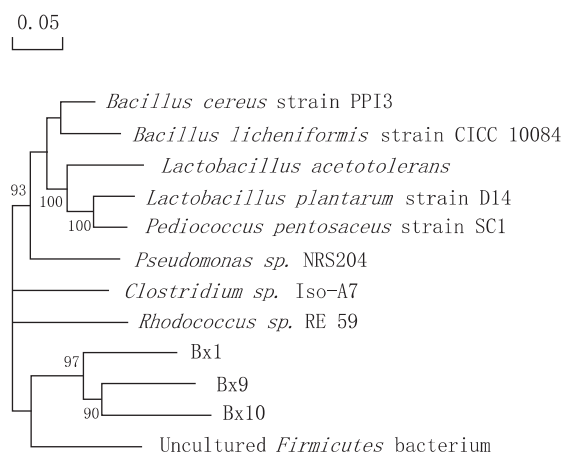


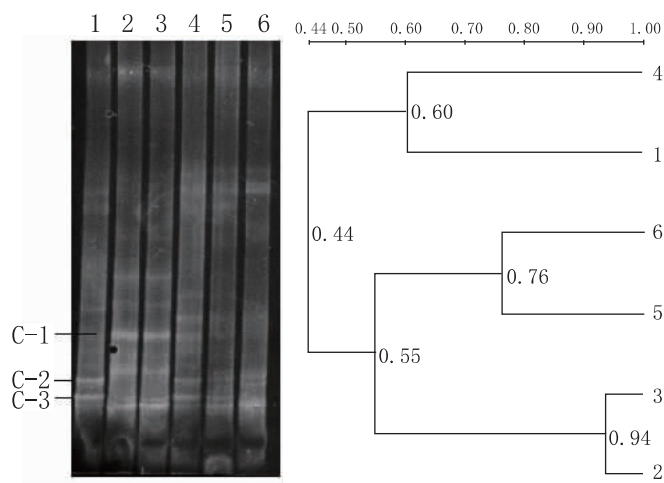
图 3 免培养菌系统发育树

图 3 显示了窖泥免培养菌同一般酿造环境中鉴定出的细菌的进化关系,主要表现为四大类:第一类是芽孢杆菌和乳酸菌构成的一簇,它们与假单胞菌构成了发育树上的第一枝节,其次是梭菌属及红球菌属,最后窖泥免培养菌与免培养的厚壁菌门组成了发育树上的最后一枝节。可以看出,3 类免培养细菌与其他 3 类中的菌群亲缘关系较远,其在进化上与厚壁菌门中的一类细菌聚成一簇。其中,Bx1 与厚壁菌门细菌亲缘关系最近,接着是 Bx9 和 Bx10,它们都是厚壁菌门中的某一新属菌群。浓香型白酒的细菌微生物研究中几乎无对厚壁菌门细菌的报道,其在窖泥中的作用还需进一步研究。

2.2 窖池古菌菌群分析

2.2.1 窖池古菌菌群的 DGGE 图谱分析

对窖池中的古菌菌群进行 DGGE 比较分析, 其 DGGE 图谱见图 4、图 5。



注: 1. 单粮窖皮; 2. 单粮窖壁; 3. 单粮窖底; 4. 多粮窖皮; 5. 多粮窖壁; 6. 多粮窖底。

图 4 夏季新窖不同位置古菌菌群变化

从图 4 可以看出, 单粮与多粮有差异, 窖壁与窖底几乎没差异, 但与窖皮有差异。窖泥的古菌菌群比较丰富, 新窖单粮窖壁与新窖单粮窖底菌群结构相似性较高, 达 94%, 新窖多粮窖壁与新窖多粮窖底相似性达 76%, 并且这 4 个样品聚为 1 支, 而新窖单粮窖皮和新窖多粮窖皮又聚为 1 支, 相似性为 60%。无论多粮还是单粮, 窖皮的古菌菌落结构明显不同于窖壁与窖底, 这也说明了古菌与氧环境的关系较为密切。

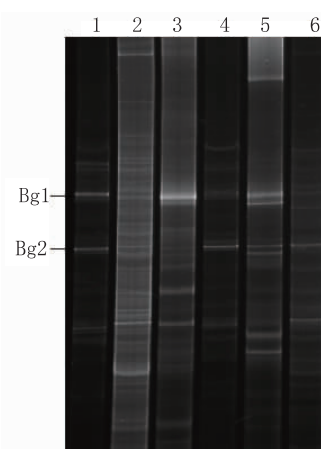
与四川理工学院甄攀等通过 PCR-SSCP (单链构象多态性) 对泸州老窖 20 年窖龄窖池的窖壁上层、下层和窖底泥的古菌微生物菌群结构分析得到的结果相似, 同一口窖内, 窖壁和窖底样品的古菌群落结构较相似。但随着窖龄的增加, 窖泥古菌的生物多样性指数呈现递增的趋势, 表现为窖泥微生物生态系统的稳定性和抵抗力的提高, 而且不同窖龄间群落结构相似性较低, 随着窖龄的增加, 窖泥古菌群落结构发生了较大的变化。

结果表明, 窖泥中的古菌主要以产甲烷菌和某些未能培养的嗜热类古菌为主。

从图 5 中可以看出, 多粮窖池中古菌微生物区系比单粮窖池庞大, 其中样品 2 (多粮窖壁泥) 中古菌群落结构多样性最为丰富。多粮糟醅中微生物区系组成较单粮复杂, 其中耗氧类菌群的繁衍与代谢造成多粮窖池内氧分压降低, 使多粮窖池中的厌氧类古菌比单粮窖池更容易富集。而在酿造发酵过程中, 有机酸和醇类等物质浸入窖泥中, 并随着黄水等液体物质下渗, 使得窖池底部越来越多地积累起厌氧功能菌, 而功能菌的生长与代谢, 逐渐

表 2 夏季窖泥 DGGE 目的条带比对结果

条带号	相似度 (%)	比对菌株	Genbank 登录号	来源
<i>Methanobacterium</i>				
C-1	95	sp YCM1 (甲烷杆菌属)	EF112196	纸浆和固体废物
	95	Uncultured archaeon clone AM33 (一类未培养的嗜热古菌)	AY092115	
C-2	100	Uncultured crenar chaeote isolate (一类泉古菌)	FJ182212	苔藓及其岩石基质
	100	Uncultured archaeon (一类嗜热古菌)	EU218627	加拿大北极区
C-3	98	同 C-2		



注: 1. 多粮窖底泥; 2. 多粮窖壁泥; 3. 多粮窖皮泥; 4. 单粮窖底泥; 5. 单粮窖壁泥; 6. 单粮窖皮泥。

图 5 冬季窖泥古菌菌群 DGGE 结构图谱

使窖泥具备老熟特征。由于样品窖泥使用年限较短的原因, 2 口窖池中的古菌菌群都未呈现老熟窖泥中微生物区系从上至下逐渐增多的分布规律。根据微生物群落结构等特征, 酒厂可进行相关营养窖泥的补充, 促进窖泥老熟。浓香型白酒的古菌微生物研究中较多是针对甲烷菌, 主要在于甲烷菌与己酸菌的共生作用, 其在窖池中的数量与己酸菌相关。

2.2.2 冬季窖泥 DGGE 主要条带序列结果分析

本实验对 DGGE 图谱中 Bg1 和 Bg2 条带进行了序列比对分析, 结果如表 3 所示。

表 3 DGGE 图谱中条带的序列比对分析

条带号	最高相似菌株	相似菌株 登录号	相似度 (%)
Bg1	Uncultured <i>methanogenic archaeon</i>	GQ453596	99
Bg2	Uncultured archaeon	DQ262618	99

鉴定结果显示, 窖底泥中主要古菌都是甲烷产生菌, 甲烷菌主要以二氧化碳、乙醇、乙酸及甲醇等为底物生产

甲烷。发酵过程中,产酸菌产生氢离子,甲烷菌等利用氢离子,降低其浓度,从而解除产酸菌的氢抑制现象。从前面的细菌菌群解析中得知,梭菌属细菌主要存在于窖池底部,而窖池中梭菌属细菌主要包括己酸菌及丁酸菌等,它们在窖底泥中与甲烷产生菌形成了互惠共生的效应。两类菌群的共酵体系可以增加酒体中的酸和香味前体物质,促进糟醅发酵,提高产酒率和产酒质量。从上述结果可以推测,习酒与大多数川派浓香型窖池相似,其中以梭菌属和甲烷菌组成的共生体系是窖底微生物区系组成的特点。

3 结论

窖池窖泥中微生物的分类鉴定对于分析窖泥的时间长短及其对酒的香味和风味影响发挥着非常重要的作用。由于不同窖龄窖泥生态中微生物的群落存在明显的差异,从而导致在不同窖龄窖池中进行发酵的糟醅中的微生物多样性有所差别,所以发酵过程中糟醅的发酵状态自然也不一样,所产的酒在质量上就存在明显的区别。从鉴定结果可以看出,夏季老窖多粮窖壁泥中的古菌主要分为两簇:*Methanoculleus* 为一簇,*Methanoculleus palmolei* 为另一簇;细菌主要分为 4 个菌群:*Petrimonas sulfuriphila*,*Thermacetogenium phaeum*,*Caloramator* 及不可培养的杆菌属,所有细菌都是厌氧的且大多数都是嗜热或嗜温的,有些具有水解蛋白能力及糖化力,加速酒糟的降解,有些能为环境中的古菌产生 H_2 或 CO_2 ,可以说窖泥中细菌和古菌共同作用生成多种活性物质降解复杂的有机物,其代谢产物在窖池特定的环境下通过复杂的生理生化反应能形成浓香型白酒的特征风味因子。

本研究对相同样品中的微生物进行了传统分类鉴定,结果显示:无论窖皮泥、窖壁泥还是窖底泥,均是窖皮泥中的原核微生物最多,窖底泥及窖壁泥中的原核微生物非常少,尤其是窖底泥。但是利用免培养的分子生物学方法,鉴定出的原核微生物是超出传统方法能力之外的。因为,首先,传统分离鉴定方法只能鉴定好氧或者兼性厌氧,而在窖壁泥及窖底泥含氧量极低的环境中,大多数微生物都是厌氧的。其次,传统鉴定方法采用平板培养微生物,最高温度即细菌的培养温度为 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$,而分子鉴定结果表明,样品中的微生物是嗜热或嗜温的,所以传统培养温度在一定程度上也限制了样品中某些微生物的分离纯化。再者,采用传统方法分离微生物,培养基中营养成分

的种类及配比含量也是影响分离结果的一个重要因素,导致了大量微生物不能培养或现阶段难于培养。因此,采用传统的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,不能全面的反映系统当中的真实的演替过程。

因此,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、有效地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。

参考文献:

- [1] 郭来虎.中国第一窖[M].北京:中国工人出版社,1999:28-29.
- [2] Ward, D M R Weller, and M M Bateson. 16S rRNA sequences reveal numerous uncultured microorganisms in a natural community[J].Nature,1990,345:63-65.
- [3] Rudolphi. Amann, Wolfgang Ludwig, and Karl-Heinz Schleifer. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation[J].Microbiological Reviews, 1995,58:143-169.
- [4] 张洪勋,王晓谊,齐鸿雁.微生物学研究方法进展[J].生态学报,2003,23(5):988-995.
- [5] 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.
- [6] 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.
- [7] 邓依,唐云容,张文学.16-23S rRNA ITS-AFLP 指纹图谱分析在白酒窖泥细菌多样性分析中的应用[J].酿酒科技,2010(3):46-48.
- [8] 焦振泉.16sRNA 序列同源性分析与细菌系统分类鉴定[J].国外医学卫生学分册,1998,25(1):12-16.
- [9] 张彤,方汉平.微生物分子生态技术:16S rRNA DNA 方法[J].微生物学报,2003,30(2):97-101.
- [10] Fischer SG, Lerman LS. Length independent separation of DNA restriction fragments in two dimensional gel electrophoresis[J].1979(16):191-200.
- [11] 邢德峰,任南琪,宋业颖,等. PCR-DGGE 分析产氢发酵系统微生物群落动态及其种群多样性[J].生态学报,2005,25(7):296-301.
- [12] Danilo E. PCR-DGGE fingerprinting. novel strategies for detection of microbes in food[J].J Microbiol Methods, 2004,56(2):297-314.

我国啤酒产量连续多年保持世界第一

本刊讯 据《糖酒快讯-食品资讯》报道,1988年至2008年的20年间,我国啤酒产量由643万千升跃升至4103万千升。从2002年开始,我国啤酒产量连续多年保持世界第一。(小小荐)

来源 糖酒快讯-食品资讯 2011-11-03