

DGGE 法初步解析浓香型白酒 糟醅微生物群落结构

李家民¹, 邹永芳¹, 王海英², 张文学^{2,3}, 李文芳²

(1.四川沱牌舍得集团有限公司, 四川 射洪 629209; 2.四川大学轻纺与食品学院, 四川 成都 610065;

3.四川大学锦江学院白酒学院, 四川 眉山 620860)

摘要: 对沱牌酒厂两个不同窖池的浓香型大曲发酵的黄水浸泡界面糟、中层糟和双轮底糟及蒸馏酒后粮糟样品所提取的总 DNA 进行细菌 V7~V8 区、真菌 18S rDNA 和古菌 V3~V4 区片段的 PCR, 后进行 DGGE 分析, 同时对糟醅真菌 DGGE 图谱中主要优势条带进行克隆测序。结果表明, 不同的窖池其糟醅细菌、古菌和真菌群落结构有一定差异, 而相同窖池的糟醅细菌、古菌和真菌群落结构具有较大的相似性。浓香型大曲发酵糟醅双轮底糟的微生物种类最为丰富, 其次是中层糟。

关键词: 糟醅; 细菌; 真菌; 古菌; DGGE

中图分类号: TS262.3; TS261.4; TS261.1; Q93-3

文献标识码: A

文章编号: 1001-9286(2013)02-0034-04

Preliminary Analysis of Microbial Communities Structure in Nong-flavor Fermented Grains in Tuopai Distillery by DGGE Technology

LI Jiamin¹, ZOU Yongfang¹, WANG Haiying², ZHANG Wenxue^{2,3} and LI Wenfang²

(1. Sichuan Tuopai Shede Group Co.Ltd., Shehong, Sichuan 629209; 2. College of Light Industry, Textile and Food Engineering,

Sichuan University, Chengdu, 610065; 3. School of Liquor-making Engineering, Jinjiang College, Sichuan

University, Meishan, Sichuan 620860, China)

Abstract: Total DNA, extracted from fermented grains soaked by yellow water, middle-layer fermented grains, double bottom fermented grains, and fermented grains after the distillation of Nong-flavor Daqu in two different pits in Tuopai Distillery, its 16S rDNA of V7-V8 region of bacteria, V3-V4 region of archaea and 18S rDNA were amplified by PCR and then treated by denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and software analysis. Meanwhile, the cloning and sequencing of the dominant bands of fungus DGGE fingerprints in distiller's grains were carried out. The results showed that there was certain difference in microbial structure in fermented grains in different pits, however, such difference was rare in fermented grains in the same pits. Microbial varieties were the richest in double bottom fermented grains and then richer in middle-layer fermented grains.

Key words: fermented grains; bacteria; archaea; fungus; DGGE

浓香型白酒的发酵生产依赖于原材料在窖泥窖池中的密闭发酵, 与一定地理环境特定窖池的微生物构成息息相关。窖池中的庞大微生物区系在糟醅“固、液、气”三相间发生复杂的物质能量代谢反应, 最终形成浓香型白酒独特成分构成和风味特征^[1]。因此酒醅中的微生物菌群结构不仅反映窖池中微环境特性, 也影响着各种风味物质的形成^[2]。因此, 认识微生物体系在发酵过程中的演

变规律非常重要。

我国对白酒的研究历史久远, 但由于技术手段的限制, 生产技术管理多半依赖于经验判断, 针对性的调整和控制较为困难。而目前关于浓香型白酒发酵过程的研究主要集中在功能菌的分离、分布及产物利用, 虽然取得了一定的成果, 但是传统方法检测和分类方法较为复杂, 具有一定的局限性^[3-5]。这些都阻碍了白酒行业发酵技术和

基金项目 四川省科技支撑计划项目(项目编号 2008SZ0112)。

收稿日期: 2012-06-05

作者简介 李家民(1964-), 男, 教授级高工, 享受国家特殊津贴的生态酿酒专家, 中国当代发明家, 中国酿酒大师, 四川省学术技术带头人, 发表论文近 30 篇, 著作 5 部, 负责及参与主研了 100 余项国家级、省部(市)级等重点项目, 获得国家级、省部(市)级科技奖励 40 余项, 获发明专利 35 项。

通讯作者 邹永芳(1977-), 女, 大学本科, 主要从事发酵技术研究, E-mail: zouyongfang1111@126.com。

优先数字出版时间 2012-08-31; 地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/52.1051.TS.20120831.0944.002.html>。

生产效率的提高。近年,张文学^[6-8]等将免培养分子生物学技术应用到白酒发酵酒醅微生物群落结构的分析中,此后 PCR-DGGE 等基因指纹图谱技术由于快速、直观准确等优势而逐渐运用于各类传统发酵食品中。

本研究主要采用 PCR-DGGE 及克隆技术,对沱牌酒厂两个不同窖池的浓香型大曲发酵的黄水浸泡界面糟、中层糟和双轮底糟及蒸馏酒后粮糟进行细菌、真菌和古菌的群落结构分析,并利用 Quantity One 软件对 DGGE 图谱进行聚类分析,同时对糟醅真菌 DGGE 图谱中主要条带进行克隆测序,鉴定糟醅中的优势真菌类群,以期能为浓香型白酒微生态研究提供更多信息。

1 材料与方法

1.1 样品

酒醅样品取自于沱牌酒厂,使用日常所用的正常酒醅取样器取样。分别取 A、B 2 个窖池浓香型大曲发酵的黄水浸泡界面糟、中层糟和双轮底糟,同时取 B、C 2 个窖池的蒸馏酒后粮糟。取样后冷冻密封保存,尽快提取总 DNA 进行实验。

1.2 实验方法

1.2.1 总 DNA 提取及 PCR 扩增

采用反复冻融裂解细胞法及试剂盒相结合的方法对糟醅样品进行总 DNA 提取,详细方法参考前述报道^[9]。细菌 16S rDNA V7~V8 区 PCR 扩增引物及程序参考已有报道^[10],扩增目的片段大小为 366 bp;古菌 16S rDNA V3~V4 区 PCR 扩增引物及扩增程序参考已有报道^[11],扩增目的片段大小为 400 bp;真菌 18S rDNA PCR 扩增引物及程序参考已有报道^[12],扩增目的片段大小为 400 bp PCR 扩增体系组成:2×Taq PCR MasterMix 25 μ L;上、下游引物(10 μ mol/L)各 2 μ L;DNA 模板 4 μ L;ddH₂O 补足 50 μ L。

1.2.2 PCR 扩增产物变性梯度凝胶电泳及图像分析

细菌、古菌和真菌的 PCR 扩增产物通过 DGGE 分析研究微生物群落的构成。丙烯酰胺凝胶浓度为 8%,PCR 产物上样量为 50 μ L,细菌和古菌的变性梯度范围为 30%~55%(100%变性剂为 7 mol/L 尿素和 40%去离子甲酰胺),真菌的变性梯度范围为 20%~40%。在 200 V、60 $^{\circ}$ C 条件下电泳 240 min。电泳完后用 SYBR green I(1×TAE,1:10000)染色 45 min(每隔 15 min 染 1 次,共染 3 次),通过紫外凝胶成像仪捕获图像。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 UPGAMA 算法进行聚类分析,并生成 DGGE 图谱相似性分析图^[9]。

1.2.3 真菌 18S rDNA DGGE 图谱中主要条带测序比对

真菌 18S rDNA DGGE 电泳后,对其主要优势条带进行切胶回收。二次 PCR 后进行纯化,参考 pUCm-T vector 说明书进行转化、克隆。挑取阳性克隆子交由北京诺赛进行序列测定。得到的序列通过 GenBank 进行比较,寻找与目的序列同源性最高的菌种 16S rDNA 序列,目的序列向日本 DDBJ 数据库进行提交。

2 结果与讨论

2.1 糟醅细菌 V7~V8 区的 DGGE 分析

按以上方法对糟醅细菌 V7~V8 区微生物进行 DGGE 分析,结果见图 1、图 2。

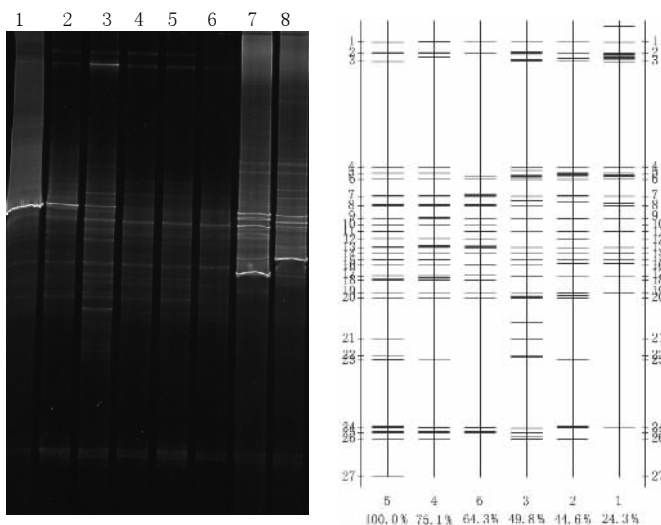
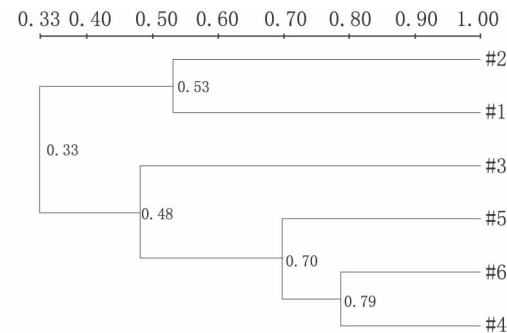


图 1 沱牌糟醅细菌 V7~V8 区 DGGE 图及识别图



1. 窖池A面糟; 2. 窖池A中层糟; 3. 窖池A双轮底糟
4. 窖池B中层糟; 5. 窖池B双轮底糟; 6. 窖池B面糟
7. 窖池C入窖粮糟; 8. 窖池B入窖粮糟

图 2 沱牌浓香型大曲发酵细菌 V7~V8 区样品相似性分析图

分析窖池 A 的 3 个泳道和窖池 B 的 3 个泳道,发现不同的窖池其糟醅细菌群落结构有一定的差异,而相同窖池的糟醅细菌群落结构具有较大的相似性,这表明,糟醅的细菌微生物群落结构跟窖池也有较大的关系。而浓香型大曲发酵糟醅的细菌丰富性较入窖粮糟差,分析其原因是入窖粮糟加入大曲,且又与车间的地面及空气接触,势必会增加大曲、空气等中的细菌。不同窖池的入窖

粮糟细菌群落结构有差别,可能是所接触地面等的细菌有所差异造成的。

根据浓香型大曲发酵泳道识别图可知,泳道5(窖池B双轮底糟)和泳道3(窖池A双轮底糟)的条带数最多,分别为27条、26条;其次是泳道2(窖池A中层糟)和泳道4(窖池B中层糟)的条带数均为22条;泳道1(窖池A糟面)和泳道6(窖池B面糟)的条带数均为19条。这表明,A、B两个窖池的双轮底糟的细菌群落结构最为丰富,其次为中层糟。分析原因可能是底糟跟窖泥和黄水接触,为细菌生长繁殖提供了较好的环境;而中层糟主要来源于入窖粮糟,其微生物主要来源于大曲,因而其细菌群落较上层糟丰富。

对浓香型大曲发酵的6个样品进行细菌相似性分析(图1),6个样品聚为一簇。一般认为,相似值高于0.60的群体具有较好的相似性^[13],泳道6和泳道4的相似值为0.79,与窖池B的中层糟和面糟的细菌群落结构较为相似,而泳道1和泳道2的相似值为0.53,说明窖池A的中层糟和面糟的细菌群落结构也较为相似。

2.2 糟醅古菌 V3~V4 区 DGGE 分析

按以上方法对糟醅古菌 V3~V4 区的微生物进行 DGGE 分析,结果见图3。

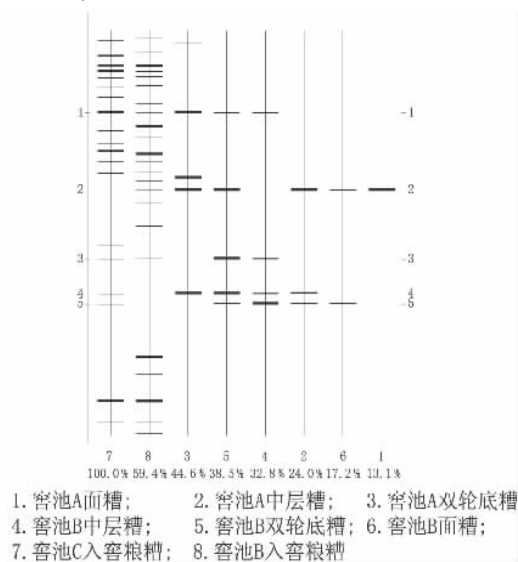


图3 糟醅古菌 V3~V4 区泳道识别图

由图3可以看出浓香型大曲发酵糟醅中古菌数量少,而入窖粮糟中则相对较为丰富。分析窖池A的3个泳道和窖池B的3个泳道,发现不同窖池其糟醅古菌群落结构有一定的差异,而相同窖池的糟醅古菌群落结构具有较大的相似性,同时表明,糟醅的古菌微生物群落结构跟窖池也有较大关系。而浓香型大曲发酵糟醅古菌丰富性较入窖粮糟差,分析其原因是入窖粮糟加入大曲,且又与车间的地面及空气接触,势必会增加大曲、空气等中

的古菌。不同窖池的入窖粮糟古菌群落结构有差别,可能是所接触地面等的古菌有所差异造成的。

泳道5(窖池B双轮底糟)和泳道3(窖池A双轮底糟)可识别的条带数均为5条,泳道2(窖池A中层糟)和泳道4(窖池B中层糟)可识别的条带数为4条和3条,泳道1(窖池A糟面)和泳道6(窖池B面糟)可识别的条带数为1条和2条。这表明浓香型大曲发酵糟醅双轮底糟的古菌种类最为丰富,其次是中层糟,这与细菌的规律性是一致的。

2.3 糟醅真菌 18S rDNA 的 DGGE 分析

按以上方法对糟醅真菌 18S rDNA 的 DGGE 进行分析,结果见图4。

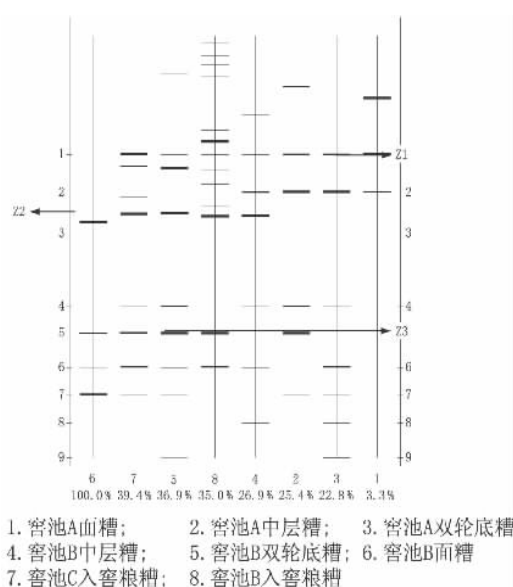


图4 沱牌糟醅真菌 18S rDNA DGGE 泳道识别图

根据 DGGE 图及泳道识别图分析可知,糟醅中真菌数量较为丰富,浓香型大曲发酵的糟醅真菌数量及丰度均比入窖粮糟的少,分析窖池A的3个泳道和窖池B的3个泳道,发现不同的窖池其糟醅真菌群落结构有一定的差异,而相同窖池的糟醅真菌群落结构具有较大相似性,这表明糟醅的真菌微生物群落结构跟窖池也有较大的关系。

泳道5(窖池B双轮底糟)和泳道3(窖池A双轮底糟)可识别的条带数均为9条,泳道2(窖池A中层糟)和泳道4(窖池B中层糟)可识别的条带数为7条,泳道1(窖池A糟面)和泳道6(窖池B面糟)可识别的条带数为4条和5条。这表明浓香型大曲发酵糟醅双轮底糟的真菌种类最为丰富,其次是中层糟,这与古菌和细菌的规律性是一致的。真菌优势条带克隆测序结果见表1。

有孢圆酵母属(*Torulaspora*)在入窖粮糟及浓香型大曲发酵中均有被检测到,而张文学^[8]等用 PCR 克隆分析的

表 1 真菌 DGGE 图谱中主要条带分子鉴定结果

条带	相似菌株	相似菌株 登陆号	最大相似度 (%)
Z1	<i>Pichia membranifaciens</i> strain NRRL Y-2026	EF550365.1	99
Z2	<i>Pichia jaroonii</i> strain CB2	HM009317.1	86
Z3	<i>Torulaspora</i> sp. SG5S08	FJ153122.1	99

方法仅在入窖糟中发现该属;而毕赤酵母属(*Pichia*)在入窖粮糟和浓香型大曲发酵糟醅中均有被检测到,且 Z2 所对应的菌极有可能是毕赤酵母属的某个新种,这与吴飞^[14]等采用传统培养加 18S rDNA 鉴定的研究结果一致。表明 PCR-DGGE 方法在酒醅微生物群落结构的分析、寻找酒醅特征微生物种群以及探讨其在酒醅发酵过程中的演变规律等方面具有可行性。

3 结论

本研究结果表明,不同的窖池其糟醅细菌、古菌和真菌群落结构有一定的差异,而相同窖池的糟醅细菌、古菌和真菌群落结构具有较大的相似性,这表明糟醅的微生物群落结构跟窖池也有较大的关系,估计与不同窖池窖泥微生物的群落结构差异有关。浓香型大曲发酵糟醅的微生物种类和丰度均少于入窖粮糟糟醅,这与入窖粮糟里新加入大曲有很大关系。

浓香型大曲发酵糟醅双轮底糟的微生物种类最为丰富,其次是中层糟,这一点在本研究的细菌、古菌和真菌群落结构分析中均已证实。一般认为相似值高于 0.60 的群体具有较好的相似性,对浓香型大曲发酵的 6 个糟醅样品进行细菌相似性分析,窖池 B 的中层糟和面糟的细菌群落结构相似值为 0.79,表明两者较为相似;窖池 A 的中层糟和面糟的细菌群落结构相似值为 0.53,也可认为两者较为相似。由此可以推测浓香型发酵糟醅面糟和中层糟较为相似。

参考文献:

[1] 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.

- [2] 施思,邓宇,李波,等.DGGE 法在盛夏习酒酒醅的微生物菌群结构解析中的应用[J].酿酒科技,2010(3):51-53.
- [3] 周瑞平,陈云宗,游玲.多粮浓香型白酒糟醅中的酵母区系的初步研究[J].酿酒科技,2010(3):34-39.
- [4] 陈敏.浓香型酒发酵过程中糟醅微生物动态研究[J].酿酒科技,1998(5):26-28.
- [5] 赵东,乔宗伟,彭志云.浓香型白酒发酵过程中酒醅微生物区系及其生态因子演变研究[J].酿酒科技,2007(7):37-39.
- [6] ZHANG WX, QIAO ZW, TANG Y Q, et al. Analysis of the fungal community in Zaopei during production of Chinese Luzhou-flavor liquor [J]. J Inst Brewing Distilling, 2007, 113(1): 21-27.
- [7] ZHANG W X, QIAO Z W, SHIGEMATSU T, et al. Analysis of the bacterial community in Zaopei during production of Chinese Luzhou-flavor liquor [J]. J Inst Brewing Distilling, 2005, 111 (2): 215-218.
- [8] 张文学,乔宗伟,胡承,等.浓香型白酒糟醅中真菌菌群的多样性分析[J].四川大学学报:工程科学版,2006, 38(5):97-101.
- [9] 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.
- [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] 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.
- [12] Shin Haruta, Shintaro Ueno, Isao Egawa, et al. Succession of bacterial and fungal communities during a traditional pot fermentation of rice vinegar assessed by PCR-mediated denaturing gradient gel electrophoresis [J]. International Journal of Food Microbiology, 2006, 109: 79-87.
- [13] 陈法霖,张凯,郑华,等.PCR-DGGE 技术解析针叶和阔叶凋落混合物分解对土壤微生物群落结构的影响[J].应用于环境生物学报,2011,17(2):145-150.
- [14] 吴飞,陈红英,胡承,等.浓香型白酒糟醅中可培养酵母 18S r DNA 全序列的系统学分析[J].酿酒科技,2006(4):23-25.

2013 年山东白酒产量将增长 20 % 以上

本刊讯 据悉,预计 2013 年山东白酒行业产量、销售收入将继续保持 20 % 以上的增长,利税的增长将大于产量、销售收入的增长幅度。芝麻香型白酒在占领省内高端市场的同时,要积极走出山东抢占全国市场。目前,全省芝麻香型白酒生产能力约为 5 万千升,到“十二五”末力争芝麻香型白酒生产能力达到 8 万~10 万千升。

加强技术改造和创新,调整产品结构。减少低档酒的生产,提升中高档酒的生产比重,把浓香低度酒与芝麻香酒两大优势酒种做精、做细,做强、做大。同时通过技术创新走不同香型工艺融合的路子,开发个性化产品、特色产品,走差异化发展的路子。

提高劳动生产效率,降低人工成本。白酒行业提高机械化水平,装备较先进的检测仪器,满足科技创新及保证食品安全的需要。力争“十二五”末山东省白酒行业实现从粉碎、通风凉糁、出窖、入窖、出甑、制曲等工艺过程实行机械化。

培育发展九大企业集团。重点发展泰山酒业、景芝、扳倒井、古贝春、兰陵、琅琊台、趵突泉、孔府家、花冠等企业集团。以名牌产品为龙头,促进强强联合,增强山东省白酒整体实力。(小小)