

浓香型白酒窖内参数变化规律及相关性研究(四) 细菌

周新虎¹, 陈翔¹, 罗惠波², 黄治国², 杨勇¹

(1.江苏洋河酒厂股份有限公司,江苏 宿迁 223800;2.四川理工学院,四川 自贡 643000)

摘要: 利用 PCR-DGGE 技术研究了洋河酒醅中的细菌群落结构及其发酵过程中的变化规律。结果表明,所有酒醅样品均出现 9~15 条较清晰的条带,其中 3 号、4 号、11 号、14 号条带在所有样品中均有检出,且优势度较高;所有样品生物多样性指数都在 1.68~2.35 之间。发酵前期,多样性指数总体呈先增加后降低的趋势,发酵第 25 天时到达最大值,之后多样性指数下降并保持相对平稳,第 60 天时有所回升。相似性指数除第 1 天和第 10 天样品细菌群落的相似性指数为 0.64,第 40 天和第 50 天细菌群落的相似性指数为 0.79 外,其他样品间的相似性指数均在 0.60 以下,表明在发酵过程中,边中位置不同发酵时间酒醅样品细菌群落间的差异较大。

关键词: 白酒酒醅; 细菌; PCR-DGGE; 16S rDNA; 微生物群落

中图分类号:TS262.3;TS261.4;Q93-3;TS261.1 文献标识码:A 文章编号:1001-9286(2012)07-0045-05

Study on the Change Rules of Parameters of Luzhou-flavor Liquor in Pits and Their Correlations (IV): Bacteria

ZHOU Xinhui¹, CHENG Xiang¹, LUO Huibo², HUANG Zhiguo² and YANG Yong¹

(1. Yanghe Distillery Co. Ltd., Suqian, Jiangsu 223800; 2. Sichuan University of Science & Engineering, Zigong, Sichuan 643000, China)

Abstract: The change rules of bacteria communities in fermented grains of Yanghe liquor in the fermentation process were analyzed by PCR-DGGE. The results were summed up as follows: 9 to 15 bands appeared clearly for all fermented grains samples, among them, No.3, No.4, No.11 and No.14 band detected in all samples and they had high degree of dominance; the diversity index of all samples kept between 1.68 and 2.35, at the early stage of the fermentation, the diversity index of samples generally increased firstly and then dropped and reached the maximum at the 25th day of the fermentation, then it dropped and kept relatively stable, and it ascended slightly at the 60th day of the fermentation; the similarity index of samples at the 40th day and at the 50th day of the fermentation was 0.79, and at the 1st day and at the 10th day was 0.64, at other times, the similarity index of samples was below 0.60, which indicated that the difference of bacteria groups in fermented grains samples at different locations in pits and during different fermentation time was obvious.

Key words: fermented grains; bacteria; PCR-DGGE; 16S rDNA; microflora

浓香型白酒的生产是以窖池和糟醅为基础,由环境微生物、大曲微生物和窖泥微生物共同作用而成的复杂的物质能量代谢过程^[1]。通过发酵过程中所产黄水的介导,糟醅与窖泥之间不断进行微生物和物质能量的交换,既为糟醅的发酵提供了丰富的微生物种群,又实现了窖泥自身的新陈代谢。因此,探讨发酵过程中浓香型白酒酒醅微生物群落特性的差异及其变化规律对浓香型白酒生产有着重要的指导意义。

前人采用平板培养,从酒醅中已分离出芽孢杆菌属、乳杆菌属、芽孢梭菌属等多种细菌类群^[2]。但是传统的分类方法培养周期长,较为复杂,而且所得出的结论与实际

情况有所偏差。

随着分子生物学技术的发展,基因指纹图谱技术越来越多的应用于白酒酿造微生物群落结构研究^[3]。如扩增的 rDNA 限制性酶切分析(ARDRA)、单链构象多态性(SSCP)、末端限制性片段长度多态性(TRFLP)、变性梯度凝胶电泳(DGGE)和温度梯度凝胶电泳(TGGE)等技术。本试验利用 PCR-DGGE 技术,研究发酵过程中酒醅优势细菌群落结构及其变化规律,为中国白酒生产提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

收稿日期:2012-02-07

作者简介: 周新虎(1962-),男,江苏宿迁人,硕士,高级工程师,江苏洋河酒厂股份有限公司总工程师,首届中国白酒科学技术大会优秀科技专家,中国食品工业协会白酒委员会专家,中国酿酒工业协会白酒委员会专家,先后荣获省部级进步奖 3 项、江苏省优秀科技工作者、宿迁市十大杰出青年、宿迁市优秀科技专家和拔尖人才,是中国绵柔型白酒始创者之一。

优先数字出版时间 2012-06-18;地址:<http://www.cnki.net/kcms/detail/52.1051.TS.20120618.1632.003.html>。

酒醅样品: 采自洋河酒厂生产窖池边中位置, 迅速置于冰盒再运回实验室, $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保藏。

试剂与设备: Taq DNA 聚合酶, 大连宝生物工程有限公司; 去离子甲酰胺, 德国 AppliChem; PCR 仪, 美国 BIO-RAD 公司 My cycle; DGGE 电泳仪, 美国 BIO-RAD 公司 Dcode; 高速冷冻离心机, 德国 Hettich 公司 U-NIVERSAL 32R; 凝胶成像系统, 美国 SIM 公司 Bio-Best200E。

1.2 试验方法

1.2.1 酒醅微生物总 DNA 提取

采用 E.Z.N.A.TM soil DNA kit 提取酒醅微生物总 DNA, 具体步骤见说明书, 然后用核酸蛋白仪检测 DNA 的浓度和纯度, 保存于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 备用。

1.2.2 引物设计与合成

采用细菌通用引物 EUB-968Gc for: 5'-CGC CCG GGG CGC GCC CCG GGC GGG GCG GGG GCA GGG GAA CGC GAA GAA CCTTAC-3' 和 EUB-L1401 rev: 5'-CGG TGT GTA CAA GAC CC-3', 扩增 16S rDNA 的 V6-V8 区^[4], 引物由上海英俊生物技术公司合成。

1.2.3 PCR-DGGE 分析

PCR 反应体系为 $50\text{ }\mu\text{L}$: $1.0\text{ }\mu\text{L}$ Taq 酶 ($5\text{ U}/\mu\text{L}$), $5.0\text{ }\mu\text{L}$ $10\times$ buffer, $3.0\text{ }\mu\text{L}$ MgCl_2 (25 mmol/L), $4.0\text{ }\mu\text{L}$ dNTPs Mixture (各 2.5 mmol/L), 引物 ($10\text{ }\mu\text{mol/L}$) 各 $1.0\text{ }\mu\text{L}$, $1.0\text{ }\mu\text{L}$ 模板 DNA (100 ng/L), $34.0\text{ }\mu\text{L}$ 灭菌双蒸水。PCR 扩增程序: $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min ; PCR 循环: $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ 10 s , $56\text{ }^{\circ}\text{C}$ 20 s , $68\text{ }^{\circ}\text{C}$ 40 s , 共 35 个循环; 然后 $68\text{ }^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min 。PCR 产物用琼脂糖凝胶电泳检测, 然后用凝胶成像系统拍照。

在 $50\text{ }\mu\text{L}$ PCR 产物中加入 $8\text{ }\mu\text{L}$ $6\times$ loading buffer 混匀, 取 $20\text{ }\mu\text{L}$ 加入 $40\%\sim 70\%$ (100% 的变性剂中含有 7 mol/L 的尿素和 40% 的去离子甲酰胺) 梯度变性聚丙烯酰胺凝胶 (交联度为 $38:2$) 的加样孔中, 胶的规格为 $20\text{ cm}\times 20\text{ cm}$, 厚 1 mm , 在 $1\times$ TAE 电泳液中电泳, 电泳温度为 $60\text{ }^{\circ}\text{C}$, 先用 200 V 电泳 4 min , 然后 130 V 电泳 14 h , 银染后拍照。

1.2.4 数据分析

研究群落多样性的方法很多, 本研究主要用丰度 (S)、优势度、样品间相似性指数 (Cs) 和 Shannon-Wiener 指数 (H) 来表示。通过 quantity one 软件对 DGGE 图谱进行分析。具体过程如下:

① 丰度 (S): 用 DGGE 图谱中条带的个数来表示。

② 优势度: 用某一特定条带的峰面积占样品总体峰面积的百分数来表示。

③ Shannon-Wiener 多样性指数^[5]: 反映群落种类与

均匀度的混合参数, 即种类数目多, 可增加多样性; 同样, 种类之间个体分配的均匀性增加也会使多样性提高。

$$H = -\sum_{i=1}^s p_i \ln p_i$$

注: H 为 Shannon-Wiener 多样性指标值; p_i 为第 i 个物种所占的百分比, 即是第 i 种的个体数与个体总数的比例; S 为样品中含有多少种不同的物种的数量, 即该样品总 DGGE 条带数。

⑤ 相似性用索伦森配对相似性系数 (Sorenson Pair-wise Similarity Coefficient)^[6] 来计算:

$$C_s = 2j / (a + b)$$

注: C_s 为索伦森配对相似性系数; a 为某一样品的 DGGE 图谱的条带数目; b 为另一样品的 DGGE 图谱的条带数目; j 为 2 个泳道所共有条带的数目。

2 结果与分析

2.1 16S rDNA PCR 扩增结果

酒醅样品微生物总 DNA 光吸收比值 $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$ 均在 $1.70\sim 1.90$ 之间。用引物 EUB-968Gc 和 EUB-L1401 扩增酒醅细菌 16S rDNA, 得到 470 bp 左右的片段 (见图 1), 符合引物设计的片段。

2.2 16S rDNA PCR-DGGE 图谱

从酒醅细菌 16S rDNA PCR-DGGE 图谱 (见图 2) 中可以看出, 所有样品均出现 $9\sim 15$ 条较清晰的条带, 说明各样品 16S rDNA PCR 产物通过 DGGE 得到了较好的分离。



注: M. DL500TM DNA Marker; 1. 发酵第 1 天; 2. 发酵第 5 天; 3. 发酵第 10 天; 4. 发酵第 15 天; 5. 发酵第 20 天; 6. 发酵第 25 天; 7. 发酵第 30 天; 8. 发酵第 40 天; 9. 发酵第 50 天; 10. 发酵第 60 天。

图 1 酒醅细菌 16S rDNA PCR 扩增结果

2.3 DGGE 图谱丰度变化规律

分析了 DGGE 图谱中细菌丰度的变化规律 (见表 1), 结果发现: 酒醅细菌的丰度值总体上呈先下降, 后上升, 再下降, 最后保持平稳的趋势。在发酵第 1 天和第 20 天时, 丰度达到最大值 15; 在发酵第 40 天、第 50 天时, 丰度值达到最低值, 仅为 9。其中, 3 号、4 号、11 号、14 号条带在所有样品中均有检出; 1 号、7 号、8 号、9 号、13 号条带, 在发酵的前中期样品中均有检出, 到了后期没有检出; 17 号、18 号、19 号条带, 只在发酵的 $2\sim 25\text{ d}$ 时有检出; 22 号条带, 只在少数几个样品中有检出。

2.4 DGGE 图谱条带优势度变化规律

分析了边中位置酒醅细菌 16S rDNA PCR-DGGE 图

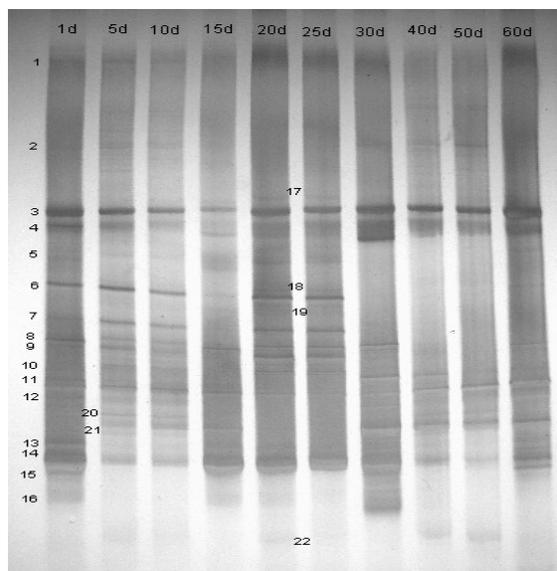


图2 酒醅细菌群落 DGGE 图谱

谱条带优势度的变化规律(见表1、图3)。结果发现,不同样品相同位置处条带的优势度变化较大。3号、4号、11号、14号条带在所有样品中均有检出,每个条带的优势度变化规律均反映出不同时间酒醅中微生物量的差异;3号条带的优势度随时间的增加基本呈现上升趋势,到60d时达到最大;4号条带的优势度呈现先增加后降低,到60d时又有上升的趋势,在15d时达到最大值;11号条带的优势度呈现先增加后降低,然后再增加又降低的

趋势,第50天时达到其最大值;14号条带的优势度在前40d呈现增加趋势,后期基本稳定。

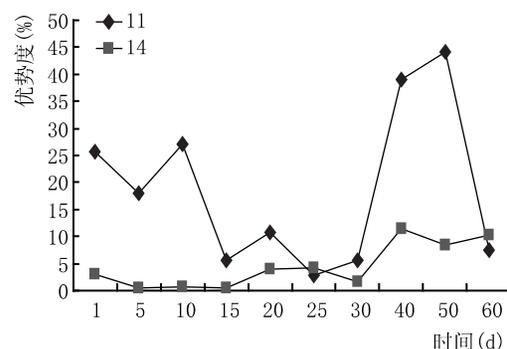
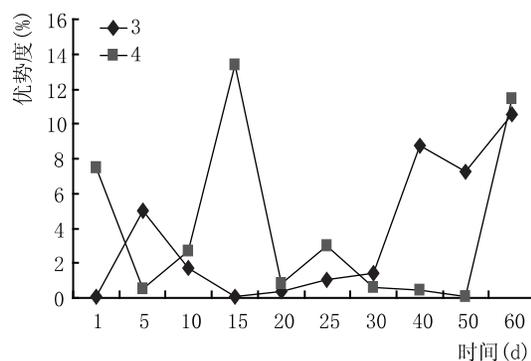


图3 酒醅细菌群落条带优势度变化规律

2.5 DGGE 图谱多样性指数变化规律

分析了 DGGE 图谱细菌群落多样性指数的变化规

表1 酒醅细菌 DGGE 图谱的丰度及优势度

样品	发酵时间(d)										
	1	5	10	15	20	25	30	40	50	60	
丰度	15	14	14	10	15	13	11	9	9	11	
1	0.85	0.11	7.131	—	—	—	—	—	—	—	
2	0.428	5.084	2.572	—	—	—	0.667	13.689	19.621	—	
3	0.103	5.027	1.689	0.098	0.397	1.072	1.401	8.77	7.24	10.521	
4	7.482	0.557	2.697	13.351	0.856	2.967	0.615	0.476	0.071	11.43	
5	6.668	1.968	6.207	2.369	1.342	9.685	—	—	—	0.778	
6	7.964	8.476	15.582	0.507	22.225	5.921	—	—	—	3.331	
7	1.195	7.108	9.133	—	10.854	10.711	—	—	—	—	
8	4.796	9.58	8.132	—	9.112	14.214	—	—	—	—	
9	25.569	12.898	5.963	26.8	0.342	1.745	15.406	—	—	1.024	
10	1.591	8.634	3.413	—	12.412	17.733	37.559	11.67	3.449	15.522	
优势度 (%)	11	25.661	17.977	27.078	5.598	10.75	2.796	5.63	38.909	44.14	7.502
12	4.428	—	—	—	—	—	4.597	—	—	—	
13	7.704	—	—	24.96	—	—	—	—	—	13.863	
14	3.143	0.438	0.758	0.464	4.075	4.259	1.596	11.332	8.43	10.264	
15	2.419	—	—	1.328	—	—	2.52	—	—	15.213	
16	—	—	—	—	0.526	—	2.76	—	—	—	
17	—	—	—	—	12.037	4.712	—	—	—	—	
18	—	—	—	—	10.247	17.114	—	—	—	—	
19	—	—	—	—	4.244	7.072	—	—	—	—	
20	—	14.169	8.639	—	—	—	—	9.954	3.767	—	
21	—	7.976	1.008	24.526	—	—	27.249	2.423	12.69	10.553	
22	—	—	—	—	0.583	—	—	2.777	0.584	—	

注：“—”为未检出。

律(见图4)。结果发现,边中位置细菌群落生物多样性指数都在1.68~2.35之间。随着发酵时间的增加,第5天、第10天、第15天的多样性指数比第1天的有所增加,第15天时开始下降,到第25天时,多样性指数达到最高;第20天、第25天样品多样性指数较接近,到了30d以后则开始降低,到第40天和第50天时逐渐趋于稳定;第30天、第40天、第50天酒醅样品细菌群落多样性指数基本保持平稳,第60天时有所回升。

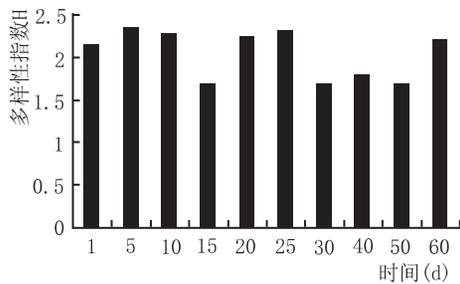


图4 酒醅细菌群落多样性指数的变化规律

2.6 DGGE 图谱相似性指数

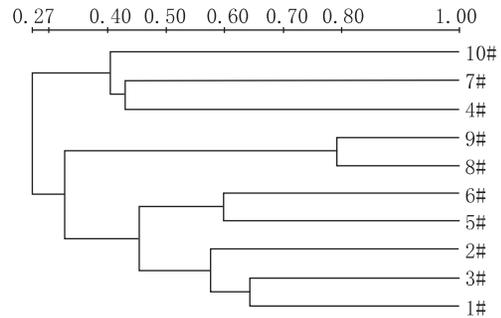
分析了酒醅细菌群指纹图谱的相似性(见表2),一般认为相似值高于60%的2个群体具有较好的相似性。结果发现:发酵第1天和第10天样品细菌群落的相似性指数为64.4%,第40天和第50天细菌群落的相似性指数为79%,其他样品间的相似性指数均在60%以下。基于相似性数据,构建UPGMA聚类图(见图5):第1天、第5天、第15天聚为1支;第20天和第25天聚为1支;第40天和第50天聚为1支。

表2 不同发酵时期酒醅细菌群落相似性 (%)

发酵时间 (d)	发酵时间 (d)									
(d)	1	5	10	15	20	25	30	40	50	60
1	100									
5	55.9	100								
10	64.4	59.2	100							
15	51.3	25.2	20.4	100						
20	33.7	45.6	46.6	13.3	100					
25	44.4	56	45.7	26.4	59.8	100				
30	27.2	30.4	26.3	42.9	33.3	39.9	100			
40	38.4	53.5	44.3	9.3	15.2	19.1	24.3	100		
50	41.9	44.5	46.6	14.9	11.1	12.4	26.2	79	100	
60	32.6	34.2	23.3	42.6	20.8	32.5	38.3	33.7	26.2	100

3 讨论

3.1 生物多样性研究中,丰度代表一定区域的物种数。DGGE将无法检测DNA在基因组中的含量少于1.5%的种群,因此,DGGE图谱所反映的是样品中的优势菌群^[7]。DGGE在一定程度上依赖于引物的设计,Myers^[8]等首次在DGGE中使用“GC夹板”和异源双链技术,使该技术日臻完善。本试验采用细菌通用引物EUB-968Gc



注:1#.发酵第1天;2#.发酵第5天;3#.发酵第10天;4#.发酵第15天;5#.发酵第20天;6#.发酵第25天;7#.发酵第30天;8#.发酵第40天;9#.发酵第50天;10#.发酵第60天。

图5 酒醅细菌群落UPGMA聚类图

和EUB-L1401利用“GC夹板”技术,扩增16S rDNA的V6-V8高变区,扩增后的DNA片段为470bp,所得的酒醅样品细菌DGGE图谱的丰度为9~15,实现了酒醅细菌的较好分离。结果发现:不同发酵时间样品的条带数差异较大,优势条带在4~6条之间,其中既有所有样品的共有条带,也有部分样品的共有条带,还有个别样品的特异条带;随着发酵时间的增加,样品条带丰度总体上呈先减少后增加再减少的趋势,到发酵后期基本趋于稳定。

3.2 条带的优势度反映的是该条带的量在整个样品中所占的比例大小。对具有代表性的优势条带的优势度分析,可在一定程度上代表酒醅细菌群落在发酵过程中的演变情况。本试验分析了酒醅细菌DGGE图谱的优势度,结果发现:在所有的酒醅样品DGGE图谱中,都检出了3号、4号、11号、14号条带,且相对于其他条带而言,优势度和变化程度均较大,说明这4条带所代表的细菌类群,可能在酒醅微生态系统中起重要的作用。

3.3 生物多样性是生态系统稳定性的基础,较高水平的生物多样性有利于生态系统功能的发挥^[7]。本试验研究发现:酒醅细菌DGGE图谱的H值为1.68~2.35。发酵前期,随着发酵时间的增加,细菌多样性指数呈先增加后递减的趋势。这可能是由于在发酵过程中,发酵产生的乙醇及酸类物质会在一定程度上影响细菌群落的多样性,另外发酵后期厌氧环境的加剧和营养关系的多样化,都会在一定程度上影响到酒醅细菌群落的多样性;发酵第25天、第60天时,多样性指数有所上升,这可能是由于发酵过程中窖泥微生物迁移进入酒醅中,使得酒醅微生物多样性指数有所升高。

3.4 相似性指数主要反映各样品条带数量之间的相似性关系,它只是最基本的多样性分析指数。郭冀峰等^[9]利用DGGE技术分析稳定塘底泥细菌种群多样性,发现西安和杭州两地尽管温度与纬度不同,但稳定塘中微生物种群的相似程度较高。赵继红^[10]等利用PCR-DGGE技术

分析啤酒废水生物处理工艺的微生物区系,发现不同深度的SBR池与水解酸化池中细菌群落的相似性存在差异。本试验对微生物群落相似性进行了分析,发现窖池边上酒醅发酵过程中相邻时间的样品细菌群落间的相似性系数较高,表明在发酵过程中,边中位置不同发酵时间样品细菌群落间的差异较大。

参考文献:

- [1] 乔宗伟,张文学,张丽莹,张其圣,岳元媛.浓香型白酒发酵过程中酒醅的微生物区系分析[J].酿酒,2005,32(1):18-22.
- [2] 张肖克,黄永光,胡晓瑜.窖泥糟醅发酵过程微生物多态性特征[J].酿酒科技,2006(1):65-70.
- [3] 张洪勋,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.
- [4] 吴鑫.DGGE指纹图谱分析太湖富营养化水体中细菌群落结构的变化[D].上海:上海交通大学,2007:36-48.
- [5] Gillan D C, Speksnijder A G, Zwart G.. Genetic diversity of the biofilm covering *Montacuta ferruginosa* (Mollusca, Bivalvia) as

evaluated by denaturing gradient gel electrophoresis analysis and cloning of PCR amplified gene fragment coding for 16S rDNA [J]. Applied and Environmental Microbiology, 1998, 64: 3464-3472.

- [6] 高平平,赵立平.微生物群落结构探针杂交评价不同培养基从活性污泥分离优势菌群的能力[J].微生物学报,2003,43(2):264-270.
- [7] 黄治国,甄攀,罗惠波.浓香型白酒窖池古菌群落研究[J].西南大学学报:自然科学版,2010,32(12):91-96.
- [8] Muyzer G, Waal E C, Uitterlinden A G. Profiling of com2 p lexmicrobial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction amplified genes coding for 16SrRNA[J]. App l Environ Microbiol, 1993, 59:695-700.
- [9] 郭冀峰,徐成浩,王俞舒. PCR-DGGE 技术在稳定塘底泥分析中的初步应用[J].安徽农业科学,2010,38(24):13318-13319.
- [10] 赵继红,何淑英,李继香,等. PCR-DGGE 分析啤酒废水生物处理工艺的微生物区系[J].环境科学,2008,29(10):2953-2955.

(上接第44页)

目的条带比对结果表明,曲心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。

从上述的三大菌群结构的比较结果来看,菌群结构相对稳定的古菌对大曲的生产质量影响似乎不大,而真菌在两季结构上的明显变化说明真菌菌群对大曲发酵质量有着关键性地影响。

4 小结

通过分类鉴定大曲微生物的菌群构成,发现习酒架式大曲主要优势菌群的构成与已有研究报告及经验积累存在一定差异。研究表明,习酒中优势和特征细菌主要为芽孢杆菌属(*Bacillus*)和葡萄球菌属(*Staphylococcus*);优势和特征酵母主要为酵母属[*Saccharomyces* (Meyen) Reess],汉逊酵母属(*Hansenula* H. et P. Sydow)、假丝酵母属(*Candida* Berkhout)和酒香酵母属(*Brettanomyces* Kuff.et V.Laer)。大曲中的优势丝状真菌菌群为毛霉属(*Mucor Micheli* ex Fries)和曲霉属(*Aspergillus*

Micheli ex Fr.)。其成品大曲与老窖大曲相比,细菌数量相当,酵母数量偏少,而霉菌数量较多;优势菌群类似,不过通过免培养技术检测到习酒大曲具有耐高温菌群,如高温放线菌、嗜热真菌属等,而泸型大曲则未检测到。由于习酒地域生态环境及制曲工艺独特,曲坯品温可高达62℃左右,这独特的极端制曲环境中自然调控了制曲环境中微生物及其代谢过程不同酶系和代谢产物的自然演替,实现了大曲生产过程不同工艺阶段对不同微生物群种的调控和需求,完成了多种微生物混合发酵过程的复杂代谢和代谢产物的多样性,富集了大量呈香呈味物质及其前体物质,产生特殊而浓郁的复合曲香,从而赋予习酒特殊的酒体风格。

致谢:本文为贵州省白酒重大科技专项《贵州白酒(非酱香型)关键共性技术研究集成与应用》子课题之一研究内容,全文为项目研究结果的部分内容综述。感谢贵州省白酒重大科技专项的资金支持。

白云边提前1个月实现任务过半

本刊讯 据初步统计,2012年1~5月,湖北白云边酒业股份有限公司实现销售收入18.39亿元,完成年计划的52.54%,较上年同期增长41.13%。上交税金2.76亿元,完成年计划的65.66%,较上年同期增长48.02%。实现利润总额2.88亿元,完成年计划的96.04%,较上年同期增长191.06%。主要经济指标提前1个月完成全年计划。其中,销售额的增幅高于销售量的增幅,利润的增幅高于收入的增幅,企业效益型增长势头更加明显。

2012年,白云边抢抓消费升级、市场走高、品牌提升的历史性机遇,乘势而上,大力实施“推高推新”的产品政策,中高端产品市场份额进一步提升。1~5月,白云边12年陈酿销量153.81万件,比上年同期增加82%;白云边42度15年、白云边45度20年、白云边45度1979纪念酒、白云边53度1979纪念酒与上年同期比,销量增幅分别达54%、76%、96%、73%。在白云边12年陈酿及以上产品强劲增长的带动下,企业发展的质量和效益水平不断提高。(王小波)