

浓香型酒醅微生物群落与理化指标的相关性分析

黄治国, 刘燕梅, 卫春会, 邓杰, 王艳丽, 祝云飞, 李觅, 万世旅

(四川理工学院酿酒生物技术及应用四川省重点实验室, 四川自贡 643000)

摘要: 本试验研究了浓香型酒醅一个发酵周期中主要的微生物群落变化规律和酒醅理化指标(淀粉、还原糖、乙醇、总酸和温度)变化规律,再分析这两者之间的相关性。结果表明:在发酵过程中,温度和还原糖呈先上升后下降最后保持平稳,乙醇和总酸呈先上升后保持平稳,淀粉含量一直下降;细菌多样性指数都在 2.12~2.80 之间,真菌多样性指数都在 1.68~2.61 之间;酒醅细菌群落的多样性与淀粉的相关系数为 0.717 ($P < 0.01$),与还原糖的相关系数为 0.744 ($P < 0.01$),与总酸的相关系数为 -0.704 ($P < 0.01$),与乙醇的相关系数为 -0.838 ($P < 0.01$),与发酵温度的相关系数为 0.622 ($P < 0.05$);浓香型酒醅真菌群落的多样性与淀粉的相关系数为 0.561 ($P < 0.05$),与其它理化指标的相关性均不显著;选择细菌 5 号和 6 号条带进行割胶测序,得到该条带的菌属为芽孢杆菌属(*Bacillus subtilis* sp)和假单胞杆菌属(*Pseudomonas* sp)。

关键词: 酒醅; PCR-DGGE; 群落结构; 相关性分析

文章编号: 1673-9078(2014)11-38-42

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2014.11.008

Correlation Analysis of the Microbial Community in Luzhou-flavor Fermented Grains and Physicochemical Indicators

HUANG Zhi-guo, LIU Yan-mei, WEI Chun-hui, DENG Jie, WANG Yan-li, ZHU Yun-fei, LI Mi, WAN Shi-lv
(Sichuan University of Science & Engineering, Liquor Making Bio-Technology & Application of Key Laboratory of Sichuan Province, Zigong 643000, China)

Abstract: The changing patterns of the dominant microbial community in Luzhou-flavor fermented grains during a fermentation cycle and the corresponding physicochemical indicators (starch, reducing sugar, ethanol, total acidity, and temperature) were studied, and the correlation between the two changing patterns was analyzed. The results showed that during the fermentation process, temperature and reducing sugar concentration first increased, then decreased, and finally remained constant; ethanol and total acid concentrations first increased and then remained constant; starch content continuously decreased. The bacterial diversity indices were all in the range of 2.12~2.80, and the fungal diversity indices ranged from 1.68 to 2.61. The correlation coefficients between microbial community diversity and starch, reducing sugar, ethanol, total acidity, and temperature were 0.717 ($P < 0.01$), 0.744 ($P < 0.01$), -0.704 ($P < 0.01$), -0.838 ($P < 0.01$), and 0.622 ($P < 0.05$), respectively. The correlation coefficient between fungal diversity and starch was 0.561 ($P < 0.05$), and no significant correlations were observed between fungal community diversity and other physicochemical indicators. Bacterial sample 5 and 6 were sequenced and identified as *Bacillus subtilis* sp. and *Pseudomonas* sp.

Key words: Fermented grains; PCR-denaturing gradient gel electrophoresis; microbial community structure; correlation analysis

浓香型白酒的生产是以酒醅为原料,以窖池为载体,在窖池发酵过程中大曲微生物、窖池微生物形成复杂的微生物群体进行一系列的物质能量代谢^[1]。在发酵过程中,窖池内的微生物群落系统将酒醅中的淀粉转化为白酒的主要成份及其微量的香味物质,窖内的理化指标呈现一定规律的变化,同时酒醅中成份的

收稿日期: 2014-04-19

基金项目: 四川省科技厅应用基础项目(07JY029-026); 酿酒生物技术及应用四川省重点实验室开放基金课题(NJ2012-06); 地方高校国家级大学生创新创业训练计划项目(201210622014)

作者简介: 黄治国(1978-),男,博士,副教授,研究方向为发酵工程

改变也引起了微生物群落生存环境的改变,如营养成份复杂化,环境酸度增加等,群落结构也有相应的改变,窖内优势菌群逐渐呈现稳定状态。微生物对酒醅的作用与窖内环境对微生物的选择使得酒醅经过一个周期的发酵能够产生具有独特风味的浓香型白酒。

近年来 PCR-DGGE 技术愈加成熟的运用于对组织结构和土壤样品种的微生物群落结构研究^[2-4],该技术也逐步运用于白酒窖内微生物多样性研究,对白酒窖内样品中微生物的多样性、丰度、准确反应^[5-7],利用 PCR-DGGE 对浓香型白酒窖泥中细菌和古菌群落进行研究,发现细菌有 9~22 条条带,古菌有 7~12 条

条带,利用PCR-SSCP对浓香型白酒酒醅进行研究,发现酒醅中的细菌和真菌各有9~20和7~16条条带^[6-7]。但这些研究都仅仅局限于单一的群落结构研究,没有对理化指标变化和微生物群落变化进行关联性研究。本实验利用PCR-DGGE技术对一个发酵周期的酒醅样品微生物多样性进行分析,同时利用美国Astoria-Pacific International(API)公司的微量自动化学分析仪检测各个样品的主要理化指标^[7](淀粉、还原糖、总酸和乙醇),加之对发酵过程酒醅温度的检测,将发酵各个阶段微生物多样性与酒醅的相关理化指标利用SPSS软件进行相关性分析,得到其规律,并利用这些规律对酒醅菌落中优势菌进行选择,择优选取条带进行测序研究。这是一种全新的对窖内酒醅相关变化和微生物动态相结合的研究方法,有利于对酒醅窖内发酵的复杂变化做相关解析。

1 试验材料与方法

1.1 试验材料

川南某酒厂酿酒车间一口老窖池中心区域和边缘区域(距窖池侧壁20cm左右)的中层(距窖顶1.0m深处)、下层(距窖顶1.5m深处)共四个点的酒醅样品,混合后立即冷藏,尽快分析。

1.2 主要试剂

葡萄糖、果糖、缓冲液干粉、苯甲酸、氯化钙、高氯酸、碘化钾、碘酸钾、PAHBAH(羟基苯甲酸酰联氨)、Brij、乙醇、酵素溶液、发色剂、酚酞、冰醋酸、氢氧化钠,以上药品均为分析纯;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。

1.3 主要仪器

连续流动化学分析仪, Micro-CFA, 美国 Astoria Pacific International; PCR 仪, 美国 BIO-RAD 公司 My cycle; DGGE 电泳仪, 美国 BIORAD 公司 Dcode; 循环水式多用真空泵, SHB-III; 高速冷冻离心机, 德国 Hettich 公司 UNIVERSAL 32R; 凝胶成像系统, 美国 SIM 公司 Bio-Best200E; 匀浆机, Mixer, 美国 Omni internatiaonal; 核酸蛋白检测仪, 美国 GE 公司 Gene Quant pro 100573。

1.4 理化指标的测定方法

1.4.1 温度监测

利用窖池中的温度传感器,对窖池各个区域的温

度进行检测,每间隔5d取一个有效值,每个实验数据由检测得到的窖池边缘与中心温度的平均值构成。

1.4.2 淀粉、还原糖、总酸和乙醇的检测

本试验淀粉、还原糖、总酸和乙醇的检测是利用自动化学分析仪分别在660 nm、410 nm、550 nm和590 nm波长检测样品中的淀粉和还原糖与其它物质反应的复合物含量,再换算得到酒醅样品中淀粉、还原糖、总酸和乙醇的含量^[8-9]。

1.5 微生物群落结构检测方法

1.5.1 样品总DNA提取

用SDS-酚氯仿抽提法^[10]提取酒醅微生物总DNA,并进行纯化,然后用核酸蛋白仪检测DNA的浓度和纯度,保存于-20℃备用。

1.5.2 PCR扩增

细菌扩增采用通用引物EUB-968Gcfor和EUB-L1401 rev,扩增16S rDNA的V6-V8区^[11],真菌扩增采用通用引物nu-SSU-0817-5'和nu-SSU-1196-3'-GC,扩增18S rDNA的V6-V8区^[12],引物由上海英俊生物技术公司合成。

细菌和真菌扩增菌采用50 μL体系,细菌PCR扩增程序:94℃ 10 s, 56℃ 20 s, 68℃ 40 s, 一共35个循环,然后68℃延伸10 min,真菌PCR扩增程序:95℃ 1 min, 48℃ 1 min, 72℃ 1 min, 一共35个循环,然后72℃延伸10 min。PCR产物用聚丙烯酰胺凝胶电泳分离,银染后拍照。

1.5.3 DGGE分析

将3次独立的PCR产物混合,然后取50 μL加入8 μL 6×loading buffer混匀,取15 μL加入40%~60%梯度变性聚丙烯酰胺凝胶的加样孔中,在1×TAE电泳液中电泳,电泳温度为60℃,先用200 V电泳5 min,然后120 V电泳14 h,银染后拍照。

1.5.4 DGGE条带回收及测序

选取回收条带,利用丙烯酰胺凝胶回收试剂盒回收目的条带,再对回收的条带进行PCR扩增(条件与上面一样,引物选择无GC夹引物),将扩增的目的DNA片段连接T载体,再利用大肠杆菌E. coli DH5α感受态转化,各样品挑选克隆得到的白色菌落3个送至上海英潍捷基测序,测序引物为344f-522r。测序结果在GenBank上进行比对,确定对应条带种属信息。

1.6 数据分析

通过quantity one软件对DGGE图谱进行分析,得到Shannon-Wiener多样性指数^[6](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)。利用quantity one软件获取DGGE图谱的优势度和丰度数据后即可得到Shannon-Wiener多样性指数。

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

注: H为Shannon-Wiener多样性指数; pi为第i个条带的优势度; S为每一个泳道的丰度值。

利用SPSS软件的Bivariate功能对酒醅样品的理化指标(温度、淀粉、还原糖、总酸和乙醇)和酒醅样品微生物多样性的相关性进行分析。

2 结果与分析

2.1 理化指标检测结果

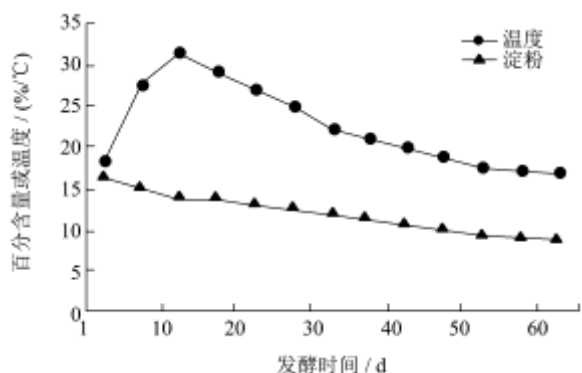


图1 温度和淀粉含量的变化曲线

Fig.1 Curve for temperature vs. starch content

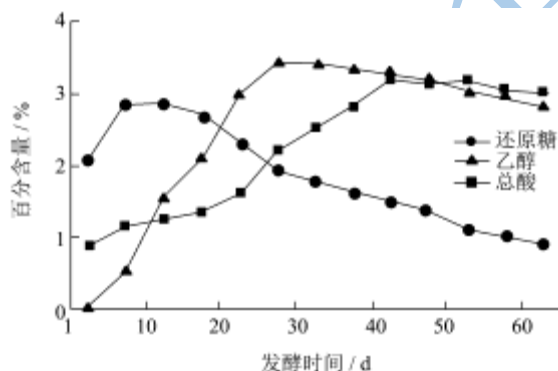


图2 还原糖、乙醇和总酸的含量变化曲线

Fig.2 Curve for reducing sugar/ethanol vs. total acidity content

试验研究了浓香型酒醅一个发酵周期中主要酒醅理化指标(淀粉、还原糖、乙醇、总酸和温度)的变化规律,结果发现:发酵过程中温度是先升高后缓慢下降,在发酵后期基本保持平衡。在发酵的1 d~10 d温度从18.5 °C上升到32 °C左右,11 d~45 d温度从32 °C下降到到19 °C左右,之后一直保持平稳(图1);酒醅淀粉含量在发酵过程中呈整体下降趋势,在发酵初期,样品中营养丰富,微生物代谢旺盛,淀粉

快速降解(图1)。

还原糖含量在发酵过程中整体呈先上升后下降的趋势,而总酸和乙醇呈先上升后保持平稳的趋势。发酵初期微生物糖化作用迅速,样品中还原糖含量迅速达到最大值2.8%左右,之后微生物大量利用,含量逐渐下降,这时样品的乙醇和总酸含量持续增加,到还原糖保持含量稳定时,总酸和乙醇液基本保持稳定,大约3.1%左右,在发酵最后乙醇含量略有下降(图2)。

2.2 微生物群落结构检测结果

通过对样品总DNA的提取,扩增酒醅细菌16S rDNA和真菌18S rDNA,得到470 bp左右和460 bp左右的片段(图3),符合引物设计的片段。



图3 酒醅细菌16S rDNA(上图)和真菌18S rDNA(下图)PCR扩增结果

Fig.3 PCR amplification of 16S rDNA fragments of the bacteria and 18S rDNA fragments of the fungi in the fermented grains

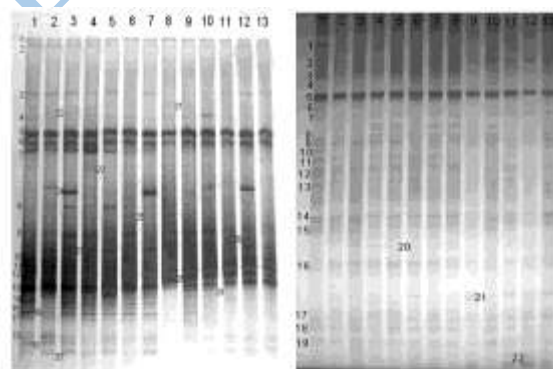


图4 酒醅细菌(左)和真菌(右)群落DGGE图谱

Fig.4 DGGE fingerprints of the bacterial and fungal microbial communities in the fermented grains

注: DL500TM DNA Marker; 1: 发酵第1 d; 2: 发酵第5 d; 3: 发酵第10 d; 4: 发酵第15 d; 5: 发酵第20 d; 6: 发酵第25 d; 7: 发酵第30 d; 8: 发酵第35 d; 9: 发酵第40 d; 10: 发酵第45 d; 11: 发酵第50 d; 12: 发酵第55 d; 13: 发酵第60 d。

试验分析了DGGE图谱(图4)中细菌和真菌群落多样性指数的变化规律,结果发现:细菌多样性指数都在2.12~2.80之间(表1)。随着发酵时间的增加,多样性指数略呈先上升后下降趋势,最后保持平稳,第10 d时多样性指数达到最大值2.80,第35 d时最低

值 2.12; 真菌多样性指数都在 1.68~2.61 之间(表 1)。随着发酵时间的开始, 多样性指数略呈先下降, 后回升, 之后保持平稳趋势, 发酵第 30 d 时, 多样性指数达到最大值 2.61, 到第 35 d 时, 多样性指数开始下降, 发酵第 40 d 时, 多样性指数达到最小值 1.68, 第 45 d 回升后又持续下降, 到发酵第 60 d 时, 多样性指数略有回升。

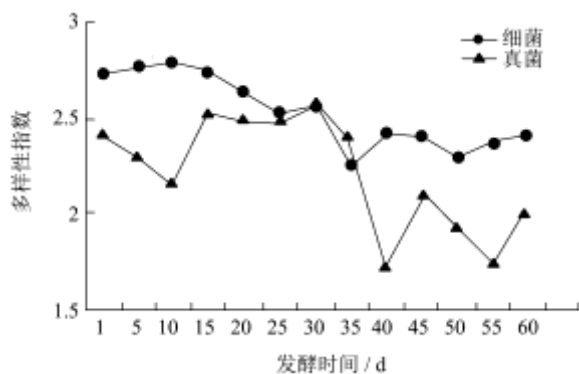


图 5 酒醅中细菌和真菌的多样性指数变化规律

Fig.5 Changing patterns of diversity indicators for the bacteria and fungi present in the fermented grains

2.3 理化指标和微生物群落的相关性分析

表 2 酒醅样品中理化指标与微生物多样性的相关性

Table 2 Correlation between physicochemical indicators and microbial diversity in fermented grain samples

显著性	淀粉	还原糖	乙醇	总酸	温度
细菌	0.717**	0.744**	-0.704**	-0.838**	-0.622*
真菌	0.561*	0.493	-0.149	-0.553	0.470

注: 相关系数的显著性用“*”表示, “**”表示相关达到显著水平 ($P < 0.05$), “***”表示相关达到极显著水平 ($P < 0.01$)。

利用 SPSS 软件的 Bivariate 功能对酒醅样品的理化指标(温度、淀粉、还原糖、总酸和乙醇)和酒醅样品微生物多样性的相关性进行了分析。结果发现: 发酵温度与细菌多样性指数呈显著负相关, 相关系数为-0.622 ($P < 0.05$), 淀粉含量与细菌多样性呈极显著正相关, 相关系数为 0.717 ($P < 0.01$), 还原糖含量与细菌多样性呈极显著正相关, 相关系数为 0.744 ($P < 0.01$), 这可能是由于发酵初期微生物将淀粉分解为还原糖, 但随着发酵的进行还原糖最终被消耗; 乙醇含量与细菌多样性指数呈极显著负相关, 相关系数为-0.704 ($P < 0.01$), 总酸与细菌多样性指数呈极显著负相关, 相关系数为-0.838 ($P < 0.01$), 这可能是由于随着总酸和乙醇的量的增多, 窖池的环境的改变, 不适合许多微生物生存, 导致细菌多样性指数下降; 对于真菌, 仅有淀粉在发酵过程中的变化与其有显著正相关, 相关系数为 0.561 ($P < 0.05$), 其余指标相关性

不显著(表 2)。

2.4 测序结果

从 DGGE 条带分析, 发现细菌 5 号和 6 号条带优势度明显, 并且随着发酵时间的增加总体呈先上升, 然后达到平稳的变化趋势, 结合理化指标中总酸和乙醇也有相似的变化规律, 这两个指标与细菌多样性指数的相关性都极显著, 因此选择 5 号和 6 号条带进行割胶测序。

将测序结果在 GenBank 网站进行比对, 找到同源性序列, 建立两个条带的系统发育树(图 5)。5 号条带序列与两株 *Bacillus subtilis* 相似菌株形成一个族群, 同源性为 99%, 这类菌株据报道在窖池中对产生己酸和丁酸等香味物质有关^[1], 因此 5 号条带的菌在窖池中对发酵过程的产香产生作用; 6 号条带序列与两株 *Pseudomonas indica* 相似菌株形成一个族群, 但同源性较低为 86%。

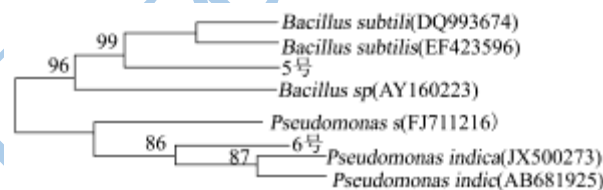


图 5 以 16S rDNA 序列为基础的 5 号和 6 号细菌条带系统发育树图

Fig.5 Phylogenetic tree of bacterial sample 5 and 6 based on 16S rDNA sequences

3 讨论

检测发酵过程中酒醅的理化指标, 了解酒醅在发酵过程中的物质变化规律, 同时分析酒醅中微生物的群落结构, 掌握发酵过程中微生物在酒醅中的变化规律。可以更加清楚的认识发酵过程中窖内物质变化和微生物变化的相互作用。真菌将淀粉转化为糖类物质能通过微生物群落与酒醅理化指标的相关性很好的展示出来, 同时细菌对白酒生香有重大作用, 随着发酵的深入, 酒醅总的理化指标不断的变化, 这时候其中的微生物群落结构也有相应的变化, 同时不同的发酵时间段, 优势微生物也有所改变。

发酵过程很多微生物的结构变化与酒醅的理化变化规律一致, 如细菌 5 号和 6 号条带, 这两个属的菌株优势度随着发酵时间的变化规律与还原糖和温度的变化规律一致。根据测试结果得到这两个条带的菌属于芽孢杆菌属 (*Bacillus subtilis* sp) 和假单胞杆菌属 (*Pseudomonas* sp), 根据文献显示, 芽孢杆菌属在发酵过程中产生己酸和丁酸等香味物质前体物, 假单胞

杆菌在窖池中也是一种优势菌属^[3],在窖池发酵过程中具有重要作用。

4 结论

本试验对浓香型白酒酒醅理化指标和微生物的多样性进行分析,得到浓香型酒一个发酵周期中主要的微生物群落多样性变化规律和酒醅理化指标(淀粉、还原糖、乙醇、总酸和温度)变化规律,并分析两者的相关性。在发酵过程中,细菌多样性指数都在2.12~2.80之间,真菌多样性指数都在1.68~2.61之间;酒醅细菌群落的多样性与淀粉和还原糖呈正相关,与总酸、乙醇和温度呈负相关;浓香型白酒酒醅真菌群落的多样性与淀粉的相关系数呈正相关,与其它理化指标的相关性均不显著;选择细菌5号和6号条带进行割胶测序,得到该条带的菌属为芽孢杆菌属(*Bacillus subtilis* sp)和假单胞杆菌属(*Pseudomonas* sp)。这种研究方法有利于对样品中的优势微生物进行分析,同时为确定特征微生物身份提供了方法。

参考文献

- [1] 张文学,岳元媛,向文良,等.浓香型白酒酒醅中化学物质的变化及其规律性[J].四川大学学报(工程科学版),2005,37(4):44-48
ZHANG Wen-xue, YUE Yuan-yuan, XIANG Wen-liang, et al. Change and rules of chemical composition in the fermented grains of chinese strong aromatic spirits [J]. Journal of Si Chuan University (Engineering Science edition), 2005, 37(4): 44-48
- [2] 王洋清,杨红军,李勇.DGGE 技术在森林土壤微生物多样性研究中的应用[J].生物技术通报,2011,5:75-79
WANG Yang-qing, YANG Hong-jun, LI Yong. Application of the DGGE technique in microbial communities diversity research [J]. Biotechnology Bulletin, 2011, 5: 75-79
- [3] LING Juan, ZHANG Yan-ying, GONG Jun-de, et al. Spatial variability of cyanobacterial community composition in Sanya Bay as determined by DGGE fingerprinting and multivariate analysis [J]. Chinese Science Bulletin, 2013, 58: 1019-1027
- [4] AbdEl-Latif Hesham, Rong Qi, Min Yang. Comparison of bacterial community structures in two systems of a sewage treatment plant using PCR-DGGE analysis [J]. Science Direct, 2011, 23: 2049-2054
- [5] Smalla K, Oros-Sichler M, Milling A, et al. Bacterial diversity of soils assessed by DGGE, T-RFLP and SSCP fingerprints of PCR-amplified 16S rRNA gene fragments: do the different methods provide similar results?[J]. J. Microbiol. Methods, 2007, 69(3): 470-479
- [6] Danilo Ercolini. PCR-DGGE fingerprinting: novel strategies for detection of microbes in food [J]. Journal of Microbiological Methods, 2004, 56: 297-314
- [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),2012,32(12):91-96
HUANG Zhi-guo, ZHEN Pan, LUO Hui-bo. Community structure of archaeal in the mud pit [J]. Journal of Southwest University (Nature Science edition), 2012, 32(12): 91-96
- [8] 罗惠波,李丹宇,杨晓东,等.连续流动法测定浓香型大曲制曲过程中淀粉含量的变化及其规律[J].现代食品科技,2013,29(3):625-629
LUO Hui-bo, LI Dan-yu, YANG Xiao-dong, et al. The change laws of starch content of Luzhou-flavor Daqu in the whole making progress by continuous flow of Chemical analyzer [J]. Modern Food Science and Technology, 2013, 29(3): 625-629
- [9] 黄治国,侯海波,罗惠波,等.浓香型酒醅发酵过程中乙醇和总酸变化规律研究[J].中国酿造,2012,31(6):53-56
HUANG Zhi-guo, HOU hai-bo, LUO Hui-bo, et al. Change of alcohol and total acid in fermented grains during fermentation of Luzhou-flavor liquor [J]. Chinese Brewing, 2012, 31(6): 53-56
- [10] Kieser T, Bibbm J, Buttnerm J, et al. Practical streptomyces genetics [M]. The John Innes Foundation, 2000: 432-436
- [11] Zoet endal E G, Akkermans A D L, De Vos W M. Temperature gradient gel electrophoresis analysis of 16S rRNA from human fecal samples reveals stable and host-specific communities of active bacteria [J]. Applied and Environmental Microbiology, 1998, 64(10): 3854-3859
- [12] Osono T, Fukasawa Y, Takeda H. Roles of diverse fungi in larch needle-litter decomposition [J]. Mycologia, 2003, 95(5): 820-826
- [13] 岳元媛,张文学,刘霞,等.浓香型白酒窖泥中兼性厌氧细菌的分离鉴定[J].微生物学通报,2007,34(2):251-225
YUE Yuan-yuan, ZHANG Wen-xue, LIU Xia. Isolation and identification of facultative anaerobes in the pit mud of chinese Luzhou-flavor liquor [J]. Microbiology, 2007, 34(2): 251-225