

# 豉香型白酒酒饼中细菌 PCR-DGGE 分析方法的建立

江汶钰, 徐学锋, 杨幼慧

(华南农业大学食品学院, 广东广州 510642)

**摘要:** 本研究以豉香型白酒酒饼中的细菌类群为对象, 针对 PCR-DGGE 分析方法中 DNA 提取、PCR 扩增、DGGE 电泳时间和凝胶染色方法等重要环节开展了相关技术参数的比较和优化。结果显示: 试剂盒法、CTAB 法、SDS 法和 SDS-CTAB 结合法等四种 DNA 提取方法中, SDS-CTAB 结合法提取的 DNA 得率最高, 蛋白质去除干净, 完整性好, 虽然步骤稍繁琐, 但优于其他方法; 经均匀设计法优化后, PCR 反应中退火温度为 50 °C, 引物浓度为 0.4 μmol/L, 模板 2.5 μL (约 34 ng) 时所扩增出的条带最清晰、产物量最高, 对应的 DGGE 分析中 DNA 条带的多样度和丰度最佳; 以进程法比较了不同时间的 DGGE 电泳效果, 发现在变性剂梯度范围为 30%~60%、电压 85 V、温度 60 °C 条件下, 电泳 9 h DGGE 胶中的 DNA 条带分离充分, 分布位置适中; 同时还发现, 利用银染色法对胶进行染色, 效果优于 Goldview 染色法。综合上述因素, 初步建立了豉香型白酒酒饼微生物 PCR-DGGE 技术的分析方法。

**关键词:** PCR-DGGE; 细菌; 豉香白酒酒饼

文章编号: 1673-9078(2015)10-307-312

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2015.10.050

## Establishment of a Polymerase Chain Reaction Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (PCR-DGGE) Method to Analyze Bacteria from Xiaoqu of Soybean-flavor Liquor

JIANG Wen-yu, XU Xue-feng, YANG You-hui

(College of Food Science South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

**Abstract:** The bacterial populations in Xiaoqu of soybean-flavor liquor were used as the study object in this paper, and the technical parameters related to DNA extraction, polymerase chain reaction (PCR) amplification, denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) time, and staining protocol for PCR-DGGE analysis were compared and optimized. The results revealed that among four DNA extraction methods (kit, cetyltrimethylammonium bromide (CTAB), sodium dodecyl sulfate (SDS), and SDS-CTAB), the SDS-CTAB method produced the highest DNA yield with a low protein content and good integrity. Despite the slightly complicated steps, SDS-CTAB was better than other methods. After optimization was achieved using the uniform design method, the optimal PCR conditions were as follows: annealing temperature of 50 °C, primer concentration of 0.4 μmol/L, and 2.5 μL (34 ng) of template DNA. Under these optimal conditions, the clearest bands were obtained, the yield of products was the highest, and the DNA bands in the corresponding DGGE analysis exhibited the best diversity and abundance. The performance of DGGE with different run times was compared using time-travel experiments, and the results showed that when the electrophoresis was conducted for nine hours using a denaturing gradient concentration range of 30%~60% at 85 V and a temperature of 60 °C, the DNA bands on the DGGE gel were sufficiently separated with an appropriate distribution. Additionally, it was found that silver staining was better than Goldview staining. In summary, a PCR-DGGE method to analyze the microorganisms in Xiaoqu of soybean-flavor liquor was preliminarily established.

**Key words:** polymerase chain reaction denaturing gradient gel electrophoresis; bacteria; Xiaoqu of soybean-flavor liquor

收稿日期: 2014-12-26

基金项目: 科技部农业科技成果转化基金项目 (2012E0002005); 广东省高等教育教学改革项目 (GDJG20142097); 广东省自然科学基金项目 (2015A030313401)

作者简介: 江汶钰 (1988-), 女, 硕士研究生; 徐学锋 (1977-), 男, 副教授, 共同第一作者

通讯作者: 杨幼慧 (1956-), 女, 教授

微生物的群落结构及其多样性直接影响发酵产物的成分构成和比例, 反之, 也受发酵产物及环境条件的影响而不断变化。因此, 寻找发酵产物的合成与微生物动态变化之间的规律, 是特定发酵条件下微生物动态分析的重要内容。传统的纯培养方法在过去相当长的时间内一直是发酵微生物研究的主流方法, 并取得了诸多成果<sup>[1]</sup>; 但也不可否认, 传统方法中微生

物分离鉴定的流程长, 采样和分析条件等对结果的影响大, 准确率差, 加之很多微生物是不可培养的, 导致这些种群分离较困难<sup>[2]</sup>, 因此, 较难准确反映微生物的群落结构与代谢产物之间的关系。随着分子生物学技术的发展, 多种用于分析微生物动态变化的方法被广泛建立<sup>[3]</sup>, 其中, PCR-DGGE (变性梯度凝胶电泳, denaturing gradient gel electrophoresis) 利用梯度变性胶能高分辨率地检测核酸序列碱基差异的特点, 从基因水平区别不同的微生物种类, 并有效比较不同样本间微生物的动态变化, 弥补了传统培养方法的缺陷<sup>[4]</sup>。目前, 该方法已经从环境微生物领域顺利过渡到了酿造食品微生物的研究中, 已在包括奶酪、香肠、泡菜、主体香型白酒等食品中得到广泛应用<sup>[5]</sup>。

豉香型白酒是主产于我国珠三角地区的小曲酒, 具有“玉洁冰清, 豉香独特, 醇和甘滑, 余味爽净”的独特风味, 在岭南地区及华侨界享有盛誉<sup>[6]</sup>。其酒曲 (酒饼) 中的微生物来源于自然接种的饼丸, 并在后续的培养和发酵环节中呈现动态变化<sup>[7]</sup>。到目前为止, 针对豉香型白酒酒曲中微生物的动态分析尚未见报道。高亦豹等应用 PCR-DGGE 技术分析了 5 种中、高温大曲中的细菌群落结构, 明确了其中的优势菌群和特色菌群, 并指出不同工艺大曲的细菌群落结构差异明显<sup>[8]</sup>。Jia 等对酱香型白酒不同窖龄的窖泥进行类似的分析, 获得 31 条不同的条带, 经鉴定后分属于 8 个不同的微生物类群, 其中以 Clostridiales、Lactobacillales 和 Bacilliales 三类为主体微生物<sup>[9]</sup>。鉴于上述主体香型白酒酒曲研究的现状和经验<sup>[10-11]</sup>, 将 PCR-DGGE 技术应用于豉香型白酒酒曲微生物动态分析有较好的可行性。但是, PCR-DGGE 技术中的影响因素众多, 如不同微生物的基因组大小和核糖体 RNA 的拷贝数不同、DNA 提取时细胞的裂解率不同、纯化技术、PCR 扩增及电泳等过程中会有偏差, 导致分析的微生物群落结构存在误差。前述浓、酱等香型酒曲中 PCR-DGGE 分析过程都未对相关参数进行优化。因此, 对一个全新的酒饼样本, 其微生物种群分布尚不清晰, 如果不对 DGGE 各环节的相应实验条件进行优化, 各分步骤的结果都会影响最终微生物种群的多样性和相对丰度<sup>[12]</sup>。

鉴于细菌以单细胞居多, 在白酒发酵中的机理不断被揭示 (如芽孢杆菌产吡嗪等<sup>[13]</sup>), 产香作用突出, 为了实现 PCR-DGGE 技术在豉香型白酒酒曲中的成功应用, 本研究以酒饼中的细菌类群为对象, 针对该技术中核酸提取、PCR 扩增和 DGGE 电泳等三个方面开展实验方法的优化。分别比较了四种不同的 DNA 提取方法, 以均匀设计进行 PCR 条件优化, 采用时间

进程法确定 DGGE 电泳最佳电泳时间, 对银染和 Goldview 染色法的进行对比, 初步建立了豉香型白酒酒饼微生物 PCR-DGGE 技术的分析方法。研究结果将为后续豉香型白酒酿造微生物的多样性分析、酿造过程中微生物群落结构演替变化规律的探索、以及优势细菌和功能性菌群在白酒酿造过程中的作用解析提供技术支持。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 样品

酒饼由广东省九江酒厂有限公司提供。

#### 1.1.2 主要仪器

PCR 仪 (Eppendorf), DGGE 系统 (Bio-Rad), 电泳仪 (BIO-RAD), 高速冷冻离心机 (Eppendorf)。

#### 1.1.3 主要试剂

(1) 预处理缓冲液 PBS: 0.0577 mol/L Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.0423 mol/L NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>;

(2) CTAB 抽提液: 2% CTAB、5 mol/L NaCl、1 mol/L Tris-HCl (pH 8.0)、0.5 mol/L EDTA、2% PVP;

(3) SDS 裂解液: 0.1 mol/L NaCl, 0.05 mol/L Tris-HCl, 0.1 mol/L EDTA, 1% SDS, 2% PVP;

(4) CTAB/NaCl 裂解液: 0.7 mol/L NaCl, 10% CTAB;

(5) 琼脂糖凝胶: 1.0%, 电泳缓冲液为 1×TAE;

(6) 聚丙烯酰胺凝胶 (丙烯酰胺: 双丙烯酰胺 = 37.5:1), 将 100% 变性梯度定义为包含 40% (V/V) 去离子甲酰胺和 7 mol/L 尿素, 采用胶浓度 8%, 变性范围 30%~60%, 1×TAE 电泳缓冲液;

(7) 银染试剂: 8×固定液 (80% 乙醇, 4% 冰乙酸)、1×固定液 (由 8×稀释)、银染溶液 (0.4 g/L AgNO<sub>3</sub> 和 12.5% 8×固定液)、显影剂 (15 g/L NaOH, 0.26% 甲醛);

(8) Goldview 染色液: 含 10% Goldview 的 TAE 缓冲液;

(9) 酚: 氯仿: 异戊醇 (25:24:1) 溶液、氯仿: 异戊醇 (24:1) 溶液、70% 乙醇、TE 缓冲液、TAE 缓冲液等均采用常规配置方法;

(10) DNA 提取试剂盒 (MiniBEST Universal Genomic DNA Extraction Kit Ver.5.0)、PCR 所用试剂 (Taq 酶, dNTP 等)、蛋白酶 K、RNA 酶等均购自大连宝生物工程有限公司;

(11) 去离子甲酰胺、丙烯酰胺、双丙烯酰胺、TEMED、过硫酸铵等常规试剂由上海捷瑞生物技术公

司提供;

(12) 16S rDNA 细菌 V3 区通用引物<sup>[14]</sup>  
(338f-GC: CGCCCGCCGCGCGGGCGGGCGGGG  
CGGGGGCACGGGGGGCCATTACCGCGGCTGCTG  
G, 518r: TACGGGAGGCAGCAG) 由上海捷瑞生物  
技术公司合成。

## 1.2 方法

### 1.2.1 总基因组 DNA 提取方法的比较

以酒饼为材料, 采用试剂盒法、CTAB 法、SDS 法和 SDS-CTAB 结合法分别提取总 DNA, 对总 DNA 进行 1% 琼脂糖凝胶电泳检测, 上样量均为 5  $\mu$ L, 比较 DNA 的颜色、琼脂糖凝胶电泳条带的完整性、利用 Quantity One V4.62 软件扫描 DNA 条带, 用形成的峰面积来度量 DNA 的得率, 并对实验过程中时间、试剂、设备需求等进行综合比较, 选择适合提取豉香型白酒酒饼微生物总 DNA 的最优方法。

预处理<sup>[8]</sup>: 称取 7.0 g 样品, 用 15 mL PBS 缓冲液悬浮, 漩涡振荡 5 min; 1000 r/min 离心 5 min, 取上清, 沉淀用 PBS 缓冲液重复洗涤 2~3 次, 离心后收集全部上清; 12,000 r/min 离心 5 min, 收集菌体; 分别用 PBS 缓冲液洗 3 次, -20  $^{\circ}$ C 保存备用。

DNA 提取方法如下:

(1) 试剂盒法: 按 DNA 提取试剂盒操作说明进行。

(2) CTAB 法: 向预处理收集的菌体中加入 1 mL CTAB 抽提液, 65  $^{\circ}$ C 水浴 45 min, 5000 r/min 离心 10 min, 收集上清; 加入等体积酚/氯仿/异戊醇溶液, 充分混匀, 1,2000 r/min 离心 10 min, 取上清; 加入等体积氯仿/异戊醇, 充分混匀, 12,000 r/min 离心 5 min, 取上清; 加 0.7 倍体积异丙醇沉淀 DNA; -20  $^{\circ}$ C 沉淀 0.5 h, 12,000 r/min 离心 10 min, 去上清; 加入 70% 乙醇洗涤 2~3 次, 吹干后加入 50  $\mu$ L ddH<sub>2</sub>O 溶解, 在 DNA 粗提液中加入 2  $\mu$ L RNase A, 37  $^{\circ}$ C, 反应 1 h, 置 -20  $^{\circ}$ C 保藏备用。

(3) SDS 法: 向预处理收集的菌体中加入 1 mL SDS 裂解液, 其余步骤同 CTAB 法;

(4) SDS-CTAB 结合法: 加入 565  $\mu$ L TE 缓冲液重悬收集的菌体; 加入 40  $\mu$ L 10% SDS 和 20  $\mu$ L 蛋白酶 K, 混匀, 37  $^{\circ}$ C 反应 1 h; 加入 100  $\mu$ L 5 mol/L NaCl 溶液, 混匀, 65  $^{\circ}$ C 反应 2 min; 加入 80  $\mu$ L CTAB/NaCl 裂解液, 混匀, 65  $^{\circ}$ C 反应 0.5 h, 加入苯酚/氯仿/异戊醇溶液, 后续步骤同 CTAB 法。

### 1.2.2 PCR 条件优化

采用降落式 PCR 和 50  $\mu$ L PCR 常规体系, 对退火

温度、模版浓度、引物浓度等三个条件进行 3 因素 5 水平的均匀设计实验 (见表 1)。将 5 个试验组合的 PCR 产物进行 1% 琼脂糖凝胶电泳检测, 同时进行 DGGE 电泳及 Quantity One (V4.62) 软件分析, 比较 PCR 产物的得率、DGGE 分析所得结果等参数, 选择最佳的 PCR 扩增条件。

表 1 PCR 条件优化的均匀设计

Table 1 Uniform design for the optimization of PCR conditions

| 试验 | 因素                 |                   |             |
|----|--------------------|-------------------|-------------|
|    | 退火温度/ $^{\circ}$ C | 引物/ $(\mu$ mol/L) | 模板/ $\mu$ L |
| 1  | 50                 | 0.4               | 2.5         |
| 2  | 53                 | 0.8               | 2.0         |
| 3  | 56                 | 0.2               | 1.5         |
| 4  | 59                 | 0.6               | 1.0         |
| 5  | 62                 | 1.0               | 3           |

PCR 程序: 94  $^{\circ}$ C 预变性 4 min 后进入 20 个循环, 94  $^{\circ}$ C 30s; A  $^{\circ}$ C 30s (注: 每循环一次后温度降低 0.5  $^{\circ}$ C); 72  $^{\circ}$ C 1min; 接着进入 10 个循环, 94  $^{\circ}$ C 30s; B  $^{\circ}$ C 30s; 72  $^{\circ}$ C 1min, 最后 72  $^{\circ}$ C 延伸 10 min。

### 1.2.3 DGGE 分析中变性梯度凝胶电泳时间及染色方法优化

(1) 电泳时间: 采用时间进程法确定最佳电泳时间, 在 85 V、60  $^{\circ}$ C 条件下电泳, 将不同的 PCR 产物混合, 每次加入 5  $\mu$ L 作为电泳样品, 上样时间间隔为 1 h, 具体为: 4、5、6、7、8、9、10 h, 根据胶中带的分布情况确定最佳的电泳时间。

(2) 染色: 用去离子水清洗梯度胶后, 将胶一分为二, 分别采用银染法和 Goldview 染色法进行染色、照相, 比较染色效果。其中, ①银染法: 将胶置于 1 $\times$ 固定液 (摇 3 min), 蒸馏水洗涤 2 次, 置于银染溶液 (摇 5 min), 洗涤 2 次, 添加显影液摇至条带清晰为止, 照相留存; ②Goldview 染色法: 将胶置于 Goldview 溶液染色 30 min, 蒸馏水中漂洗 10 min, 紫外成像仪上照相留存。

### 1.2.4 软件分析

将各试验的 PCR 扩增产物同时进行 DGGE 电泳, 应用 Quantity One V4.62 软件分析指纹图谱, 经泳道识别、条带识别和配对三个步骤, 对图谱中的条带进行定量分析, 分别计算各 PCR 试验中细菌群落的多样性 (Shannon) 指数、丰富度 (Simpson) 指数, 作为 PCR 优化结果的评价依据。

## 2 结果与讨论

### 2.1 DNA 提取方法的比较

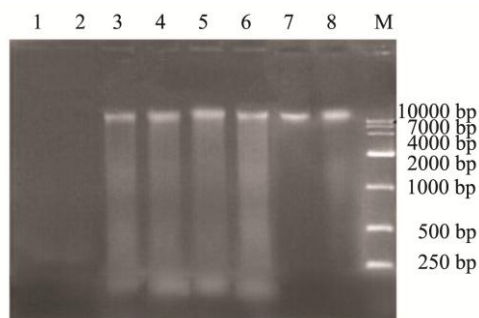


图1 四种方法的总 DNA 提取结果

Fig.1 Result of total DNA extracted using four methods

注: 1、2: 试剂盒法, 3、4: SDS 法, 5、6: CTAB 法, 7、8: SDS-CTAB 结合法。

酒饼样品经预处理后, 分别用试剂盒法、CTAB 法、SDS 法和 SDS-CTAB 结合法提取总 DNA, 经琼脂糖凝胶电泳后的结果如图 1, 利用 Quantity One

表 2 各 DNA 条带的峰面积

Table 2 Peak areas of DNA bands

| 方法   | 试剂盒法 |   | SDS 法 |       | CTAB 法 |       | SDS-CTAB 法 |       |
|------|------|---|-------|-------|--------|-------|------------|-------|
| 泳道编号 | 1    | 2 | 3     | 4     | 5      | 6     | 7          | 8     |
| 峰面积  | 0    | 0 | 48.81 | 53.09 | 57.07  | 51.04 | 66.68      | 62.30 |
| 平均值  | 0    |   | 50.95 |       | 54.06  |       | 64.49      |       |

## 2.2 PCR 反应相关因素的优化

针对模板浓度、引物浓度、退火温度等三个因素, 以 SDS-CTAB 法提取得到的 DNA 为模板, 进行 PCR 均匀设计优化实验。PCR 产物的琼脂糖电泳如图 2 所示, 试验 5 没有获得目的条带, 试验 1 的条带亮度明显优于 2、3、4; 对电泳图进行扫描及计算峰面积, 结果(表 3)显示试验 1 为 106.19, 明显高于其他条带。

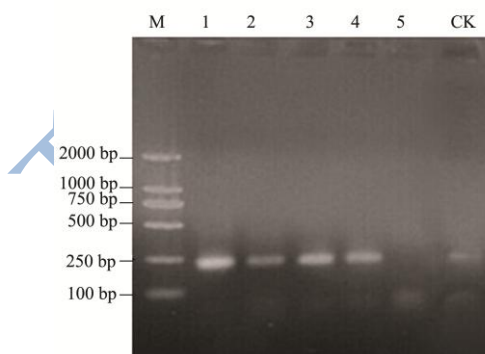


图 2 PCR 优化结果电泳图

Fig.2 Electrophoresis image after PCR optimization

注: M 为 2000 DNA ladder, 1~5 泳道分别为实验 1~5, 的 PCR 结果, CK 为未经优化的 PCR 结果。

对 5 个试验的 PCR 产物分别进行 DGGE 电泳,

V4.62 软件对电泳图中总 DNA 条带进行峰面积扫描, 度量 DNA 的得率见表 2。

综合比较发现, 试剂盒法未提出 DNA; SDS 法和 CTAB 法提取出的 DNA 颜色呈浅黄色, 说明蛋白质未去除干净, 二者电泳条带均较明亮, 平均峰面积值在 50-55 之间, 较为接近, 但电泳条带有拖尾现象, 后续的 PCR 扩增试验需多次重复才能得到扩增结果; SDS-CTAB 结合法提取出的 DNA 呈白色, 电泳条带未出现拖尾现象, 峰面积均值为 64.49, 均高于其他三个方法。

从操作上看, SDS-CTAB 结合法虽然步骤较繁琐, 耗时也较长, 但经纯化后的基因组溶液在浓度、纯度等方面都比较高。综合比较得出 SDS-CTAB 结合法提取酒饼微生物 DNA 效果较好。

结果如图 3, 未经 PCR 优化的样品 CK, PCR 产物浓度过低, 导致 DGGE 结果条带不清晰, 甚至有些条带无法显现。试验 1、3、4 的电泳条带较为丰富, 清晰度高, 其中试验 1 最优。计算各试验的多样性(Shannon)指数、丰富度(Simpson)指数见表 4。试验 1 的多样性指数为 2.94、丰富度指数即条带数为 26, 在 5 组中数值最高。综合比较各试验的结果, 认为试验 1 对应的 PCR 条件最优, 即退火温度为 50 °C, 引物浓度为 0.4 μmol/L, 模板 2.5 μL (约 34 ng)。

表 3 各 PCR 条带的峰面积

Table 3 Peak areas of PCR bands

| 泳道   | 1      | 2    | 3     | 4     | 5 | CK    |
|------|--------|------|-------|-------|---|-------|
| 峰面积值 | 106.19 | 50.7 | 78.23 | 63.49 | 0 | 17.95 |

表 4 DGGE 指纹图谱多样性指数

Table 4 Diversity indexes of DGGE fingerprints

| 序号 | Simpson 指数 | Shannon 指数 |
|----|------------|------------|
| CK | 11         | 2.17       |
| 1  | 26         | 2.94       |
| 2  | 8          | 1.56       |
| 3  | 21         | 2.67       |
| 4  | 18         | 2.43       |
| 5  | 4          | 1.16       |

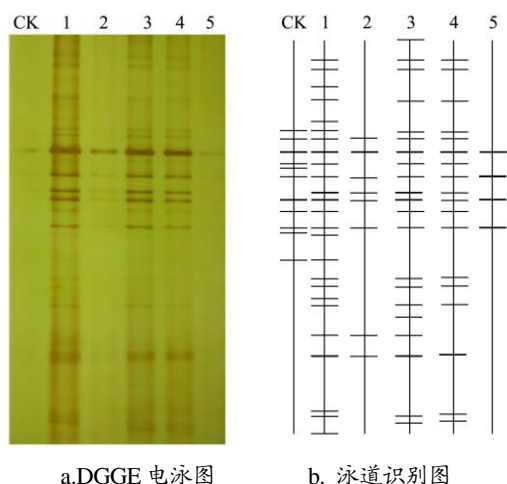


图3 PCR 优化试验的 DGGE 电泳图

Fig.3 DGGE images after PCR optimization

注：泳道 CK：未经 PCR 优化的 DGGE 结果，泳道 1~5：分别代表实验组 1~5。

### 2.3 DGGE 分析中变性梯度凝胶电泳时间及染色方法优化

#### 2.3.1 DGGE 电泳时间的优化

由于样品中可能含有的菌数量多，选择合适的电泳条件在整个分析过程中有至关重要的作用，电泳条件的优劣直接关系到条带分离的好坏。本研究根据时间进程法，将待测样品以恒定时间间隔（1 h）在同一块胶版上点样，使样品的电泳时间有一个梯度，电泳图谱结果如图 4 所示。



图4 不同 DGGE 电泳时间的电泳图谱

Fig.4 Electrophoresis image of DGGE with different electrophoresis times

通常，时间越长样品条带分开的机会越大。本实验中电泳时间在 4~8 h 内的条带未完全分开，分辨率差；而达到 9 h 时，条带变得非常清晰，分辨率很高；10 h 时泳道内条带太靠近底部，易使条带跑出凝胶之外。因此，选择将水平胶电泳时间控制在 9 h 左右最好。

#### 2.3.2 染色方法的对比

将 DGGE 电泳得到的电泳胶分别进行银染和 Goldview 染色，效果分别如图 5。从图谱上看，银染色的效果明显优于 Goldview，不仅图谱清晰，条带亮度亦有差别，其灵敏度很高，便于图像分析软件定量得出更加准确的结论。

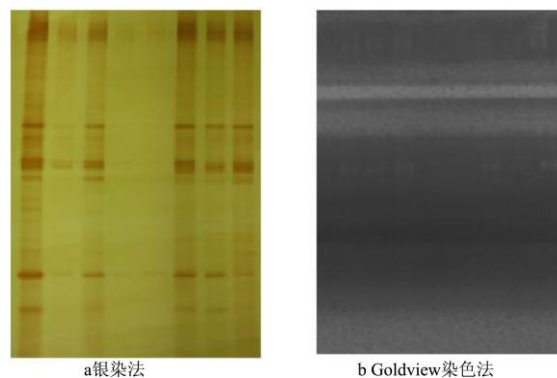


图5 银染法和 Goldview 染色电泳图谱

Fig.5 Electrophoresis images after AgNO<sub>3</sub> and Goldview staining

## 3 结论

3.1 DNA 的抽提是 PCR-DGGE 分析的前提，不同的方法都有各自的特点，也都有成功的应用。CTAB 法主要依赖 CTAB 在高盐浓度下螯合裂解液中的蛋白质和多糖，经酚和氯仿的变性作用得以去除，然后浓缩得到优质 DNA，已较早应用于浓香型白酒中<sup>[15]</sup>，并不断被领域内的研究者沿用。SDS 是一种阳离子表面活性剂，主要作用是裂解细胞壁、使蛋白质变性从而释放 DNA，多用于植物和真菌等细胞壁结构较为致密的物种。豉香型白酒酒曲相关微生物研究涉及到酒丸、酒饼、发酵醪液等不同材料，其中酒饼会经历不同的贮藏期，含水量很低，DNA 提取非常困难。本研究中 SDS-CTAB 结合法从酒饼样品中提取的 DNA 质量和得率最高，蛋白质去除干净，完整性好，分析原因是 SDS 提高了细胞的裂解率，与 CTAB 结合后两种主体成分的功能实现了有效互补；商业试剂盒未能提取到 DNA，可能是由于样品的特殊性造成的。

3.2 PCR 反应中模板和引物的浓度以及二者的比例对 PCR 产物得率的影响最大，另外根据引物与模板的特异性不同，退火温度也是一个关键因素之一。对部分文献进行总结发现，通常模板用量为纯化后 DNA 1~4 μL（或 10~50 ng），引物浓度为 0.2~0.4 μmol/L，退火温度为 49~60 °C<sup>[14]</sup>，参数范围相对宽泛，这些差异对 PCR 反应的质量有哪些影响，在酒曲微生物研究方面鲜有比较。本研究采用均匀设计直观评价法优化后，PCR 体系中模板用量为 2.5 μL，通过 DNA 电泳图像的灰度比较定量为约 34 ng，退火温度为 50 °C，

均在合理范围内,所扩增出的条带最清晰、产物量最高,对应的 DGGE 分析中 DNA 条带的多样度和丰度最佳,表明该参数与酒饼样本有较好的适应性。

3.3 大多数的 DGGE 分析中电泳胶的配置参数变化不大<sup>[13]</sup>,变性剂梯度范围通常为 30%~60%,电泳温度为 60 ℃,差异主要表现在电泳电压和时间上,电压从 60~200 V 不等,时间为 4~16 h,或高压短时,或低压长时。本研究在 85 V 的电压下通过时间进程法进行比较,非常清晰地发现在该条件下电泳 9 h,条带分离充分,也没有条带溢出的风险,所得的图像完全能够满足酒饼微生物分析的需要。同时还发现,利用银染色法对胶进行染色,虽然存在一些环保和健康问题,但效果明显优于 Goldview 染色法,SYBR green I 等新型染料也不断被应用,但成本略高,技术细节更严谨一些。

3.4 综合上述因素,本研究以豉香型白酒酒饼中的细菌类群为对象,针对 PCR-DGGE 分析方法中 DNA 提取、PCR 扩增、DGGE 电泳时间和凝胶染色方法等重要环节,开展相关技术参数的比较和优化,所得结果初步建立了豉香型白酒酒饼微生物 PCR-DGGE 技术的分析方法,为后续豉香型白酒酿造微生物的多样性分析、酿造过程中微生物群落结构演替变化规律的探索、以及优势细菌和功能性菌群在白酒酿造过程中作用的解析提供技术支持。

## 参考文献

- [1] 郭良栋.中国微生物物种多样性研究进展[J].生物多样性,2012,20(5):572-580  
GUO Liang-dong. Progress of microbial species diversity research in China [J]. Biodiversity Science, 2012, 20(5): 572-580
- [2] Merlin W Ariefdjohan, Dennis A Savaiano, Cindy H Nakatsu. Comparison of DNA extraction kits for PCR-DGGE analysis of human intestinal microbial communities from fecal specimens [J]. Nutrition Journal, 2010, 9(23): 1-8
- [3] Luc á Gonz ález-Arenzana, Rosa L ópez, Pilar Santamar á, et al. Dynamics of lactic acid bacteria populations in Rioja wines by PCR-DGGE, comparison with culture-dependent methods [J]. Applied Microbial and Cell Physiology, 2013, 97: 6931-6941
- [4] Xiaowei Zheng, Zheng Yan, Beizhong Han, et al. Complex microbiota of a Chinese "Fen" liquor fermentation starter(Fen-Daqu),revealed by culture-dependent and culture-independent methods [J]. Food Microbiology, 2012, 31: 293-300
- [5] Haiyan Wang, Yibao Gao, Qingwen Fan, et al. Characterization and comparison of microbial community of different typical Chinese liquor Daqu by PCR-DGGE [J]. Applied Microbiology, 2011, 53: 134-140
- [6] 李大和.试论豉香型白酒独特风格的成因[J].酿酒科技, 2004, 121(1):24-27  
LI Da-he. Discussion on the formation of the specific style of soybean-flavor liquor [J]. Liquor-making & Technology, 2004, 121(1): 24-27
- [7] 徐成勇.豉香型白酒酒饼微生物的分离[J].食品与发酵工业,2002,28(10):10-12  
XU Cheng-yong. Isolation of microbes from xiaoqu for chi-flavor type of Chinese spirits [J]. Food and Fermentation Industries, 2002, 28(10): 10-12
- [8] 高亦豹.聚合酶链式反应-变性梯度电泳技术(PCR-DGGE)研究中国白酒大曲中微生物群落结构[D].无锡:江南大学,2010  
GAO Yi-bao. Investigation of microbial community of Chinese liquor Daqu by Polymerase Chain Reaction-Denaturing Gradient Gel Electrophoresis [D]. Wuxi: Jiangnan University, 2010
- [9] Jia Zheng, Ru Liang, Liqiang Zhang, et al. Characterization of microbial communities in strong aromatic liquor fermentation pit muds of different ages assessed by combined DGGE and PLFA analyses [J]. Food Research International, 2013, 54(1): 660-666
- [10] Haiyan Wang, Xiaojun Zhang, Liping Zhao, et al. Analysis and comparison of the bacterial community in fermented grains during the fermentation for two different styles of Chinese liquor [J]. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, 2008, 35: 603-609
- [11] Xiaomao Xiong, Yuanliang Hu, Nanfeng Yan, et al. PCR-DGGE analysis of the microbial communities in three different Chinese "Baiyunbian" liquor fermentation starters [J]. Journal of Microbiology and Miotechnology, 2014, 24(8): 1088-1095
- [12] Jae-Hyung Ahna, Yoo-Jeong Kima, Taesung Kim, et al. Quantitative improvement of 16S rDNA DGGE analysis for soil bacterial community using real-time PCR [J]. Journal of Microbiological Methods, 2009, 78: 216-222
- [13] 吴建峰,徐岩.白酒细菌酒曲固态培养条件下 *B.subtilis* S12 产四甲基吡嗪的合成机制[J].食品与生物技术学报,2014, 33(1):8-15  
WU Jian-feng, XU Yan. Formation mechanism of tetramethylpyrazine produced with *B.subtilis* S12 under the

- fermentation condition simulated bacterial Qu preparation used for Chinese liquor brewing [J]. *Journal of Food Science and Biotechnology*, 2014, 33(1): 8-15
- [14] Muyzer G, De Waal E C, Uitterlinde A G. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1993, 59(3): 695-700
- [15] Wenxue Zhang, Zongwei Qiao, Shigematsu T, et al. Analysis of the bacterial community in Zaopei during production of Chinese Luzhou-flavor liquor [J]. *Journal of the Institute of Brewing and Distilling*, 2005, 111(2): 215-222

现代食品科技