

不同性状窖泥的细菌群落结构与酸酯含量分析

袁玉菊¹, 张倩颖¹, 曾丽云¹, 张文学^{1,2*}

1(四川大学 轻纺与食品学院, 四川 成都, 610000) 2(四川大学 锦江学院 白酒学院, 四川 眉山, 620860)

摘要 为了解不同性状窖泥细菌群落结构及酸酯代谢的差异, 分别选取新窖泥、趋老熟窖泥和老熟窖泥, 对其细菌 16S rDNA 的 V3 区进行变性梯度凝胶电泳分析和同源性比较, 并结合窖泥主要有机酸及有机酸酯含量进行了典型相关分析。结果表明, 老熟窖泥的细菌多样性指数及均匀度指数高于新窖泥和趋老熟窖泥, 得到的 39 个优势条带, 进行细菌 DNA 测序可分为 14 类; *Clostridium* XIVa、*Aminobacterium* 均只在老熟窖泥中检测到; 新窖泥和趋老熟窖泥与 *Lactococcus*、*Lactobacillus*、乳酸、乳酸乙酯含量正相关, 老熟窖泥与 Clostridiales、己酸、己酸乙酯和丁酸含量正相关。

关键词 窖泥; 细菌群落; 变性梯度凝胶电泳 (denaturing gel gradient electrophoresis, DGGE); 酸酯含量

中国白酒历史悠久, 其中浓香型白酒产量最大, 酒厂主要集中在四川一带, 以特色的封闭泥窖作为发酵容器, 采用混蒸混烧工艺, 素有千年窖池万年糟的说法, 随着窖池使用时间的增长, 不断地封窖、发酵、开窖, 逐渐形成了一个庞大且独特的微生物体系^[1]。生产经验表明, 窖泥作为此体系的主要载体, 其品质和酒质密切相关, 白酒酿造过程中, 细菌对其香气成分的构成起着相当重要的作用。正常情况下, 随着窖泥逐渐老熟, 其白酒的质量也趋于优质和稳定, 窖泥中的微生物群落也在发生着变化, 有益微生物逐渐累积, 更利于好酒的产出。但窖泥自然老熟过程缓慢, 易受到环境因素的影响。因此, 探究新窖泥、趋老熟窖泥和老熟窖泥的细菌群落差异, 了解其与主要有机酸及有机酸酯含量的相关性, 对于定向促进新窖的老熟, 维护窖泥的稳定具有重要意义。

窖池是一个封闭的厌氧系统, 很多微生物难以培养, 传统的微生物培养技术存在着一定局限性, 因此克隆文库、变性梯度凝胶电泳 (denaturing gel gradient electrophoresis, DGGE)、高通量测序等免培养分子技术被越来越多地用于窖泥微生物群落结构的研究, 其中 PCR-DGGE 技术快速、易操作, 准确性高, 能克服传统微生物研究方法的不足, 得到广泛应用^[2]。本研究应用 PCR-DGGE 技术结合典型相关分析方法对

新窖泥、趋老熟窖泥和老熟窖泥的细菌群落及酸、酯含量进行初步探讨, 以期更多地了解不同性状窖泥中细菌群落、主要有机酸、有机酸酯之间的差异及其窖泥特征性, 从而能更好地把控浓香型白酒生产过程, 使其处于较优的稳定状态。

1 材料与方法

1.1 样品采集

2015 年 11 月取自四川西部某酒厂, 6 个样品均为窖底泥, 新窖泥、趋老熟窖泥和老熟窖泥主要结合窖池投产时间以及所产白酒酒质判断, 各性状窖泥采集 2 窖池作为平行, 编号分别为新窖泥 (1a 和 1b, 5 年窖池)、趋老熟窖泥 (2a 和 2b, 10 年窖池)、老熟窖泥 (3a 和 3b, 50 年窖池), 采用五点取样法取样, 混合均匀后用冰盒运回实验室, 立即提取总 DNA。

1.2 实验方法

1.2.1 窖泥样品总 DNA 提取及 PCR 扩增

采用 Soil DNA Kit (Omega Bio-Tek, USA) 提取窖泥样品总 DNA。用引物^[3] P2 (5'-ATTACC GCGGCT-GCTGG-3') 和 P3 (5'-CGCCGCGCGCGCGCGCGGGC-GGGCGGGGGCACGGGGGGCCT ACGGGAGGCAG-CAG-3') 对细菌 16S rDNA 的 V3 区进行扩增, 得到片段大小约为 233 bp。PCR 反应体系参考 LIANG^[4]。扩增用 touch-down 程序: 94 ℃ 预变性 4 min; 94 ℃ 变性 1 min, 65 ℃ 退火 1 min, 72 ℃ 延伸 1 min, 20 个循环, 每个循环降低 0.5 ℃; 最终 94 ℃ 变性 1 min, 55 ℃ 退火 1 min, 72 ℃ 延伸 1 min, 10 个循环。所得 PCR 产物用 2% 琼脂糖凝胶电泳检测。

第一作者: 硕士研究生 (张文学教授为通讯作者, E-mail: foode-coengineering@163.com)。

基金项目: 基于风味指纹图谱的浓香型白酒固态发酵微生物强化共培养技术研究及应用 (其他) (014CDDY-S03-SCU)

收稿日期: 2016-07-27, 改回日期: 2016-09-06

1.2.2 窖泥酸、酯的色谱检测

取 10 g 窖泥,用体积分数为 15% 的甲醇溶液定容至 100 mL,30 ℃ 超声 40 min,0.45 μm 孔径滤膜过滤后得到窖泥浸提液待测。

采用气相色谱(安捷伦 7890)检测窖泥提取液的己酸、丁酸、乙酸、己酸乙酯、乳酸乙酯和乙酸乙酯。气相色谱条件:进样口温度 250 ℃,进样量 0.5 μL,柱箱初始温度 40 ℃,保持 5 min,然后 5 ℃/min 升到 80 ℃,保持 0 min,再以 10 ℃/min 升到 120 ℃,保持 0 min,再以 15 ℃/min 升到 210 ℃,保持 12 min。

采用安捷伦 1260 液相色谱仪和安捷伦 6430A 质谱检测器检测乳酸,流动相为甲醇和水(60:40,体积比),每次进样 5 μL,分析时间为 5 min,流量为 2 mL/min,色谱柱为 XDB-C₁₈(4.6 mm × 50 mm),选择离子法扫描,选择离子为 89.1。

1.2.3 16S rDNA V3 区 PCR 产物梯度变性凝胶电泳

细菌 16S rDNA V3 区扩增片段通过 DGGE(Bio-Rad)分析其细菌群落,丙烯酰胺胶浓度为 8%,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),上样量为 40 μL,在 1 × TAE 中,100 V,60 ℃ 条件下电泳 220 min^[4]。电泳结束后用 SYBR Green I(1:50 000)染色 45 min。通过紫外成像系统获取图像,对优势条带切胶回收后送至生工测序,测得序列通过 GenBank 进行 BLAST 同源性比对。

1.2.4 数据分析

利用分析软件(Quantity One, Bio-Rad)对 DGGE 图谱图像进行预处理去除背景,根据条带的光密度值对图谱数据进行量化,据此计算 Simpson 指数、Shannon-wiener 指数与均匀度指数,以反映群落种类多样性及个体分布的均匀性,计算方法如下:

Simpson 指数: $D = 1 - \sum P_i^2$

Shannon-wiener 指数: $H' = -\sum P_i \ln P_i$

均匀度指数: $E = H/H_{\max}$,

式中: P_i , 种的个体数占群落中总个体数的比例; H , 实际观察的物种多样性指数; H_{\max} , 最大的物种多样性指数, $H_{\max} = \ln S$ (S 为群落中的总物种数)。

同时采用 WPGAMA 算法进行聚类分析生成系统发育树。

典型相关分析是一种研究两组变量之间相关关系的多元统计分析方法,以 DGGE 图谱量化后的细菌含量数据作为种变量,以标准化处理后的酸酯含量作为环境变量,运用统计学软件 Canoco for windows

进行典型相关分析(CCA),研究不同性状的窖泥样品细菌群落结构和酸酯含量之间的相关性。

2 结果与讨论

2.1 DGGE 图谱分析

从图 1 的 DGGE 指纹图谱,结合 Quantity One 分析可知,条带 4、5、23、24、34 和 39 均只在老熟窖泥中检测到,新窖泥和趋老熟窖泥样品中条带 10 和 14 的亮度明显大于老熟窖泥,说明窖泥逐渐老熟中,细菌种类及优势菌群都发生着变化。

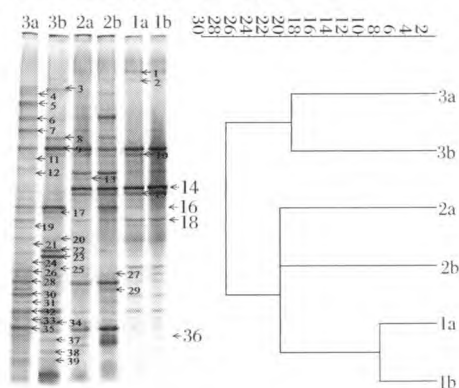


图 1 新窖泥、趋老熟窖泥和老熟窖泥细菌 16S rDNA 的 PCR-DGGE 图谱及条带系统发育树

Fig. 1 PCR-DGGE fingerprints and cluster analysis of 16S rDNA extracted from bacterial community in new, trend to be aging and aging pit mud

结合表 1 可知,窖泥老熟过程中,细菌多样性指数呈现缓慢升高的趋势,均匀度指数也逐渐上升,说明窖泥中的细菌群落逐渐达到一个稳态,且细菌群落变化是一个复杂且缓慢的过程^[5]。

表 1 新窖泥、趋老熟窖泥和老熟窖泥细菌群落多样性指数
Table 1 Diversity of 16S rDNA extracted from bacterial community in new, trend to be aging and aging pit mud

样品	simpson 指数 (D)	Shannon-wiener 指数 (H')	均匀度指数 (E)
3a	0.955 7	3.305	0.772 8
3b	0.945 4	3.117	0.728 2
2a	0.939 0	3.052	0.705
2b	0.937 8	3.016	0.680 1
1a	0.920 5	2.944	0.632 8
1b	0.928 6	2.944	0.612 9

从系统发育树来看,老熟窖泥明显与新窖泥、趋老熟窖泥分开,单独成一簇,新窖泥和趋老熟窖泥聚成一大簇,又各分为两簇,说明老熟窖泥细菌群落与新窖泥、趋老熟窖泥有较大区别,新窖泥和趋老熟窖

泥在细菌群落进化上有一定差异,但与老熟窖泥相比新窖泥和趋老熟窖泥更为接近。王海英^[6]等人提出50年是窖池细菌群落进化的一个分界线,本文中老熟窖泥样品为50年窖泥,进一步证实了该看法。可能是在窖泥老熟过程中,由细菌群落结构的量变逐渐引起窖泥性状的改变,直至达到细菌群落进化的质变,窖泥呈现老熟状态,从而与新窖泥和趋老熟窖泥状态发生了明显差别。

2.2 优势条带测序分析

切取 DGGE 图谱中优势条带,测序后经 NCBI 和 RDP 同源性比对,结果如表 2 所示,共得到 14 类,窖泥中细菌主要为拟杆菌目、梭菌目和乳杆菌目。其中,条带 4 (*Clostridium* XIVa)、5 (unclassified Bacteroidetes)、23 (unclassified Syntrophomonadaceae)、34 (*Aminobacterium*) 和条带 24、39 (unclassified Clostridiales) 只在老熟窖泥中检测到。*Clostridium* XIVa、*Aminobacterium* 等似乎可成为潜在的老熟窖泥指针菌,LIU^[7]等研究结果显示 *Aminobacterium* 具有降乳酸的功能。结合 DGGE 图谱条带光密度可以看出,老熟窖泥中 *Lactococcus* (条带 1 和 2) 与 *Lactobacillus* (条带

12、14 和 15) 含量低于新窖泥和趋老熟窖泥,这与 TAO^[8]等的研究结果类似。有研究表明,*Lactobacillus* (条带 1、2、12、14、15 和 21) 最终产物是乳酸,大量乳酸的存在会抑制己酸的合成^[9]。另外, Clostridiales 目各类梭菌在老熟过程是逐渐增加的,据报道梭菌对浓香型白酒香气的形成起着非常重要的作用,其主要代谢产物是己酸、丁酸和氢^[10],WEINER 报道的 *Clostridium kluyzeri* 的己酸产量更是达到了 12.9 g/L^[11]。浓香型大曲酒的主体香是己酸乙酯,乳酸和乳酸乙酯也是白酒风味的重要组分,但过量乳酸和乳酸乙酯对出酒率和白酒风味质量有严重影响^[12],因此,新窖泥与趋老熟泥的乳酸菌高于老窖泥可能是导致老窖酒的口感普遍优于新窖酒的原因。

此次还检测到了 *Petrimonas* 属 (条带 7、13、17、18 和 20) 和 unclassified Syntrophomonadaceae (条带 23 和 27), *Petrimonas* 可以利用葡萄糖产生乙酸、H₂ 和 CO₂ 等^[1,11]。*Syntrophomonas* 与甲烷菌共生时可产生乙酸和 H₂,而甲烷菌正好可以利用乙酸和 H₂^[8,12,14],此类种间氢转移来控制氢气分压有利于己酸的形成。

表 2 细菌 16S rDNA 的 DGGE 优势条带测序结果

Table 2 Identities of 16S rDNA sequences of bands excised from DGGE gel by using BLAST and RDP search tools

条带	目/科	Genebank 相似菌种(属)	登录号
1,2,21	Streptococcaceae	<i>Lactococcus</i>	LC158002,LC158003,LC158030
12,14,15		<i>Lactobacillus</i>	LC158018,LC158020,LC158021
31	Clostridiaceae	<i>Clostridium sensu stricto</i>	LC158042
4,19	Lachnospiraceae	<i>Clostridium</i> XIVa	LC158005,LC158027
16,22,24,25,28,29,30,33,37,39	unclassified Clostridiales	-	LC158024,LC158032,LC158034LC158035,LC158039,LC158040LC158041,LC158044,LC158048,LC158051
35,36	unclassified Clostridiaceae	-	LC158046,LC158047
6,8,10	Porphyromonadaceae	Unclassified <i>Porphyromonadaceae</i>	LC158008,LC158013,LC158015
7,13,17,18,20		<i>Petrimonas</i>	LC158011,LC158019,LC158025,LC158026,LC158029
5	unclassified Bacteroidetes	-	LC158007
23,27	Syntrophomonadaceae	unclassified <i>Syntrophomonadaceae</i>	LC158033,LC158038
32,34,38	Synergistaceae	<i>Aminobacterium</i>	LC158043,LC158045,LC158050
11	Enterobacteriaceae	<i>Pantoea</i> sp.	LC158016
26	Sphingomonadaceae	unclassified <i>Sphingomonadaceae</i>	LC158036
3,9	-	<i>Candidatus cloacamonas</i>	LC158004,LC158014

2.3 窖泥细菌群落和酸、酯含量的典型相关分析

新窖泥、趋老熟窖泥和老熟窖泥的酸、酯含量检测结果如表 3 所示,结合酸、酯含量与细菌群落进行典型相关分析 (CCA), 结果如表 4。

根据表 4 典型相关分析结果,典型变量 1 和典型

变量 2 解释了样本中 82.9% 的变异,前 4 个典型变量共解释了 98.8% 的样本总变异,4 个典型变量的种-环境相关系数为 1,说明细菌群落结构与本实验所检测的酸、酯存在极强的相关性。根据典型变量 1 和 2 生成二维排序图 (图 2),典型变量 1 和典型变量

2、与酸、酯的相关系数如表 5 所示,其中相关性较高的有己酸乙酯、己酸、丁酸、乳酸和乳酸乙酯。

表 3 窖泥提取液酸、酯检测结果

Table 3 Content of acids and esters in new , trend to be aging and aging pit mud 单位:mg/g(窖泥)							
样品	乙酸乙酯	己酸乙酯	乳酸乙酯	乙酸	丁酸	己酸	乳酸
3a	0.048 0	0.024 6	0.014 0	2.251 0	0.501 6	2.155 4	6.914 5
3b	0.046 2	0.649 8	0.127 6	2.023 5	1.441 1	12.720 2	11.574 7
2a	0.056 8	0.109 4	0.470 5	1.707 2	0.602 5	3.915 4	15.686 7
2b	0.042 5	0.033 4	0.515 3	1.956 7	0.428 7	1.613 7	27.301 1
1a	0.066 2	0.024 4	0.283 1	1.207 5	0.334 9	0.996 4	25.100 3
1b	0.034 7	0.002 1	0.165 5	0.891 7	0.353 1	1.238 6	37.137 9

表 4 典型相关分析结果

Table 4 Canonical correlation analysis of new ,trend to be aging and aging pit mud				
项目	典型变量 1	典型变量 2	典型变量 3	典型变量 4
特征值	0.148	0.088	0.038	0.007
种-环境相关系数	1.000	1.000	1.000	1.000
种-环境累积百分比变化率	52.1	82.9	96.4	98.8

表 5 典型变量与酸、酯的相关系数

Table 5 Typical variable correlation coefficient with acid and ester							
项目	乙酸乙酯	己酸乙酯	乳酸乙酯	乙酸	丁酸	己酸	乳酸
典型变量 1	-0.240 0	0.916 6	-0.842 4	0.588 5	0.414 0	0.908	-0.889 6
典型变量 2	-0.012 5	0.344 6	0.012 6	0.158 2	0.899	0.035	-0.085 7

从排序图可以看出,老熟窖泥(3a 和 3b)与己酸、己酸乙酯和丁酸呈正相关,与乳酸及乳酸乙酯呈负相关,图 1 系统发育树中 3a 和 3b 聚为一类,但在典型变量 1 轴上比较接近,在典型变量 2 轴上相距较远,可能是 CCA 分析中, Syntrophomonadaceae、 Synergistaceae 和 Lachnospiraceae 对典型变量 2 贡献大,而 2 个样品中这 3 个细菌含量有一定差异引起的。新窖泥(1a 和 1b)与趋老熟窖泥(2a 和 2b)则可以归为一大类,与乳酸和乳酸乙酯正相关,与己酸、己酸乙酯及丁酸负相关。造成新窖泥及趋老熟窖泥与老熟窖泥有此相反结果的原因可能是新窖泥及趋老熟窖泥中可以产乳酸 *Lactococcus* 与 *Lactobacillus* 含量较高,而老熟窖泥中可以产己酸的 *Clostridiales*、具有降乳酸功能的 *Aminobacterium* 含量较高。综合优势条带微生物及其可能产物的分析,可以大致认为, *Streptococcaceae*(*Lactococcus* 与 *Lactobacillus*)是新窖泥与趋老熟窖泥的典型微生物, *Clostridiaceae* 是老熟窖泥的典型微生物。

3 结论

此次对新窖泥、趋老熟窖泥和老熟窖泥细菌群落

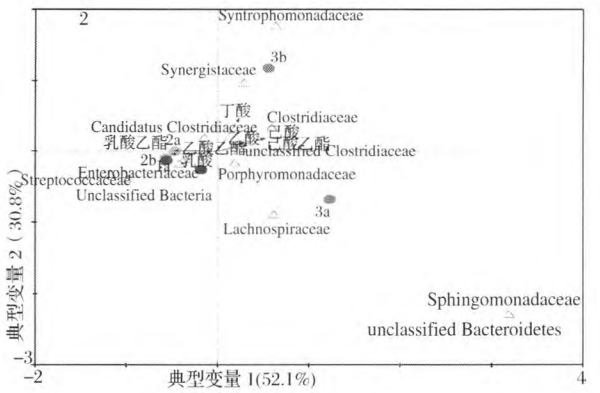


图 2 新窖泥、趋老熟窖泥和老熟窖泥 CCA 分析图
Fig. 2 Canonical correlation analysis of new ,trend to be aging and aging pit mud

的 PCR-DGGE 及与有机酸、有机酸酯的典型相关分析表明,新窖泥、趋老熟窖泥有较大的相似性,老熟窖泥则与新窖泥、趋老熟窖泥有明显的差别,前者具有更高的细菌群落稳定性和群落均匀性。老熟窖泥与己酸、己酸乙酯及丁酸含量呈正相关,与乳酸及乳酸乙酯含量呈负相关,新窖泥、趋老熟窖泥则相反,这可能正好是老窖酒口感优于新窖酒的原因。*Lactococcus* 与 *Lactobacillus* 对新窖泥、趋老熟窖泥贡献较大,而 *Clostridiales* 对老熟窖泥贡献较大;*Clostridium* XIVa、*Aminobacterium* 均只在老熟窖泥中检测到,可考虑进一步探讨其成为潜在的老熟窖泥指针菌的可能性。

参 考 文 献

[1] 施思,王海英,张文学,等. 浓香型白酒不同窖泥的微生物群落特征分析[J]. 酿酒科技,2011(5):38-41.
[2] 李德林,张宿义,毛振宇,等. PCR-DGGE 对浓香型白酒糟醅微生物群落结构解析[J]. 酿酒科技,2014(3):25-31.
[3] MUYZER. G,DE WAAL E C,UITTERLINDEN A G. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reac-

- tion-amplified genes coding for 16S rRNA [J]. Applied and Environmental Microbiology, 1993, 59(3): 695–700.
- [4] LIANG Hui-peng, LI Wen-fang, LUO Qing-chun, et al. Analysis of the bacterial community in aged and aging pit mud of Chinese Luzhou-flavour liquor by combined PCR-DGGE and quantitative PCR assay [J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2015 (95): 2 729–2 735.
- [5] 黄治国, 刘艳梅, 卫春会, 等. 基于 PCR-DGGE 的浓香型白酒窖泥细菌群落结构研究 [J]. 西南大学学报 (自然科学版), 2014, 36(8): 167–172.
- [6] 王海英, 张文学, 施思, 等. 水井坊窖底泥微生物群落结构的 DGGE 分析 [J]. 中国酿造, 2012, 31(2): 38–41.
- [7] LIU Chao-lan, HUANG Dan, LIU Lai-yan, et al. *Clostridium swellfunianum* sp. nov., a novel anaerobic bacterium isolated from the pit mud of Chinese Luzhou-flavor liquor production [J]. Antonie van Leeuwenhoek International Journal of General and Molecular Microbiology, 2014 (106): 817–825.
- [8] TAO Yong, LI Jia-bao, RUI Jun-peng, et al. Prokaryotic communities in pit mud from different-aged cellars used for the production of chinese strong-flavored liquor [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2014, 80(7): 2 254–2 260.
- [9] 姚惟琦, 陈茂彬, 镇达, 等. 浓香型白酒酒醅中乳酸菌分离及其对模拟固态发酵的影响 [J]. 酿酒, 2010, 27(3): 37–41.
- [10] 李大和, 刘念, 李国红. 浓香型大曲酒酿造中酯化菌研究的现状与展望 [J]. 酿酒科技, 2008, 164(20): 92–98.
- [11] WEIMER P J, STEVENSON D M. Isolation, characterization, and quantification of *Clostridium kluyveri* from the bovine rumen [J]. Microbiol Biotechnol, 2012, 94: 461–466.
- [12] 周恒刚. 窖泥培养 [M]. 北京: 中国计量出版社, 1998.
- [13] 张文学, 乔宗伟, 等. PCR 技术对浓香型白酒糟醅细菌群的解析 [J]. 四川大学学报 (工程科学版), 2005, 37(5): 82–87.
- [14] ZHANG C Y, LIU X L. *Syntrophomonas curvata* sp. nov., an anaerobe that degrades fatty acids in co-culture with methanogens [J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2004, 54: 969–973.

Analysis of bacterial community and acid, ester contents in pit mud with different characteristics

YUAN Yu-ju¹, ZHANG Qian-ying¹, ZENG Li-yun¹, ZHANG Wen-xue^{1,2*}

¹(College of Light Industry, Textile and Food Engineering, Sichuan University, Chengdu 610000, China)

²(School of Liquor-making Engineering, Jinjiang College, Sichuan University, Meishan 620860, China)

ABSTRACT To further understand bacterial community structure, metabolism of acids and esters differences among new, aging and aged pit mud of Chinese Luzhou-flavor liquor, V3 region of bacterial 16S rDNA and the major organic acids and esters in pit mud were analyzed through a combination of PCR-DGGE and canonical correlation analysis. The results showed that the bacterial diversity index and evenness index of aged pit mud were higher than those of the others. 39 preponderant bands were obtained, which could be divided into 14 categories by sequencing. *Clostridium* XIVa and *Aminobacterium* were only detected in aged pit mud. New and aging pit mud were positive correlation with contents of *Lactococcus*, *Lactobacillus*, lactic acid and ethyl lactate, while aged pit mud was positive correlation with contents of Clostridiales, caproic acid, butyric acid and caproate.

Key words pit mud; bacterial community; denaturing gel gradient electrophoresis (DGGE); acid and ester contents