

PCR – DGGE 解析浓香型大曲发酵、储藏过程 真菌群落的演替规律

叶光斌^{1,2}, 李丹宇¹, 杨跃寰¹, 罗惠波^{1,2}, 杨晓东¹

(1. 四川理工学院生物工程学院, 四川 自贡 643000; 2. 酿酒生物技术及应用四川省重点实验室, 四川 自贡 643000)

摘要:以浓香型大曲培菌发酵期(0–10 d)和储藏期(20–100 d)共 12 个大曲样品为研究对象,采用 PCR – DGGE 技术解析浓香型大曲制备过程真菌群落结构的变化。PCR – DGGE 图谱表征的微生物群落丰度、优势度及多样性指数分析结果表明:大曲制备过程中,真核微生物群落结构复杂多样。发酵环境的剧烈变化及真菌群落间的协同和制约效应均对大曲制备过程中真核微生物群落组成产生影响。

关键词:浓香型大曲;真菌;18S rRNA 基因;PCR – DGGE;微生物群落演替

中图分类号:Q938.1

文献标志码:A

大曲是传统白酒工业生产中不可或缺的糖化和发酵生香剂,是白酒风格形成与品质形成的基础所在^[1]。大曲中微生物种群丰富且相互作用机理复杂,通过传统的微生物分离手段已得到的微生物有霉菌、细菌、酵母菌和放线菌等^[2],但是常规培养方法耗时长,准确率低,且可培养的微生物仅占其微生物总类的 0.1% – 10%^[3]。随着分子生物学的发展,基因指纹图谱技术越来越多的应用于微生物群落结构的研究。其中 DGGE 技术由于不需要对样品微生物进行培养,可直接研究其基因指纹图谱,具有检测极限低、易操作和可重复性强等特点^[4]。目前 PCR – DGGE 在白酒发酵研究方面主要集中在酒醅、窖泥、成品大曲的微生物区系^[4-11],但对大曲制备全过程微生物群落结构动态演替鲜有报导。

众所周知,浓香型白酒生产用曲一般选用储存 3 个月左右的大曲,在大曲制备到生产应用这段时间内,大曲微生物区系发生了怎样的变化,有待更加深入的研究。本研究采集浓香型大曲制备期的培菌发酵期(0–10 d)和储藏期(20–100 d)大曲样品共 12 个,在此基础上获得表征浓香型大曲制备过程真菌群落结构的 PCR – DGGE 指纹图谱,并对其丰度、优势度和多样性指数的

变化进行解析。本研究对于阐明大曲制备过程微生物群落演替规律,揭示大曲发酵环境与微生物群落演替间的相互作用关系提供数据支持。

1 材料与方法

1.1 样品采集

浓香型大曲取自泸州老窖制曲公司,大曲样品分别为培菌期 1 d、5 d、10 d 和储藏期 20 d、30 d、40 d、50 d、60 d、70 d、80 d、100 d,共 12 个大曲样品,样品编号为 1–12。采用五点取样法取各个时期曲房不同位置的曲样(曲房上、中、下层、外层、内层各取 5 块大曲),用粉碎机粉碎,混合均匀后,采用“四分法”^[12]得到所需样品,–20 °C 保存,用于后续基因组 DNA 提取及理化分析。

1.2 大曲微生物总 DNA 的提取与纯化

用 SDS – 酚氯仿抽提法提取大曲微生物基因组 DNA^[13],E. Z. N. A.™ Soil DNA Kit (美国 Omega 公司)吸附柱进行纯化,然后用核酸蛋白仪检测 DNA 的浓度和纯度,保存于 –20 °C 备用。

1.3 PCR 扩增及 DGGE 电泳

50 μL PCR 反应体系为:1.0 μL Taq 酶(5 U/μL)

收稿日期:2013-05-13

基金项目:四川省教育厅重大培育项目(09ZZ015);酿酒生物技术及应用四川省重点实验室开放基金项目(NJ2009-02, NJ2010-05, NJ2011-05)

作者简介:叶光斌(1980-),男,安徽池州人,讲师,博士,主要从事酿酒生物技术方面的研究,(E-mail) guangbin1980@126.com

(大连宝生物工程有限公司), 5.0 μL 10 倍缓冲液, 3.0 μL MgCl_2 (25 mmol/L), 4.0 μL dNTPs 混合物(各 2.5 mmol/L), 引物(10 $\mu\text{mol/L}$)各 1.0 μL , 1.0 μL 模板 DNA(约 100 ng/mL), 34.0 μL 灭菌双蒸水; 引物对 FF390(5' - CGA TAA CGA ACG AGA CCT - 3') / FR1 - GC(CGC CCG GGG CGC GCC CCG GGC GGG GCG GGG GCA CGG GGG GAI CCA TTC AAT CGG TAI T)用于真菌 18S rRNA 基因的扩增, 目的基因长度为 430 bp, PCR 扩增程序见参考文献^[14]。PCR 产物琼脂糖凝胶电泳检测后用于后续的 DGGE 分析。

DGGE 电泳条件为: 聚丙烯酰胺凝胶变性范围为 30% ~ 55%, 200 V 预电泳 5 min, 120 V 电泳 12 h, 电泳温度为 60 $^{\circ}\text{C}$, 上样量 18 μL ^[14]。

1.4 PCR - DGGE 图谱的分析

根据 DGGE 图谱中每个样品不同条带的强弱及迁移率, 可对图谱中的条带进行匹配分析, 并根据 Neighbor - joining 算法, 采用 QuantityOne (Bio - Rad) 分析软件对不同样品的 DGGE 带谱进行微生物群落相似性程度分析。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)来表征群落多样性^[15]。

2 结果分析与讨论

2.1 大曲微生物 DNA 的提取及 18S rRNA 基因的扩增

纯化后的大曲微生物 DNA, 使用 FF390/FR1 - GC 扩增, 扩增效果良好, 条带清晰, 且无杂带。PCR 扩增结果如图 1 所示。



M 为 Marker, 1 - 12 号分别对应大曲制备 1 d, 5 d, 10 d, 20 d, 30 d, 40 d, 50 d, 60 d, 70 d, 80 d, 90 d, 100 d 收集的大曲样品的 PCR 扩增结果。

图 1 12 个大曲样品 FF390/FR1 - GC 引物 PCR 扩增结果

2.2 浓香型大曲不同制备阶段真菌 18S rDNA PCR - DGGE 图谱

通过真菌 18S rDNA PCR - DGGE 图谱可以较为清晰的比较大曲前期培菌及后期储藏的制备全过程中真核微生物群落组成及丰度的变化规律(图 2)。从图 2 可以看出, 所有样品均出现 7 - 17 条较清晰的条带, 说明在聚丙烯酰胺凝胶的变性范围为 30% - 55% 条件下, 各样品得到了较好的分离。

2.3 PCR - DGGE 图谱的条带丰度、优势度的分析

大曲真菌 DGGE 图谱条带丰度、条带优势度的变化

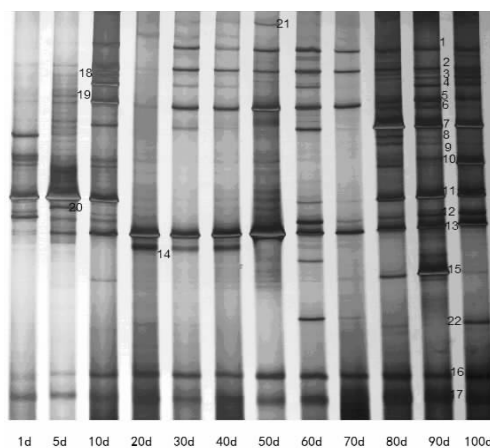


图 2 大曲制备过程真菌 18S rRNA 基因 PCR - DGGE 图谱

规律的分析结果见表 1。

大曲培菌期第 5 d 时, 环境适宜, 营养丰富, 适合大部分微生物生长繁殖, 此时真菌丰度迅速增加至 14, 这与章肇敏, 王世宽等通过传统分离培养方法的研究结果一致^[16-17]。发酵 5 - 10 d 大曲处于高温发酵期, 由于高温、高湿环境, 大多数微生物不能生长, 霉菌和酵母菌均大幅下降^[18], 但由于前期微生物的积累, 大曲中存在大量孢子或菌体细胞, 故该时期检测出条带数仍然较多, 导致这一时期的丰度值仅有略微下降。发酵 20 d 后, 大曲离开培菌室进入储藏室, 曲房温度、湿度下降, 营养物质消耗, 同时翻曲也可能导致微生物之间的物质和能量交换的破坏, 微生物活性降低, 故检出条带数减少, 丰度值降至最低值 7。发酵第 20 - 40 d, 大曲进入堆积转化期, 由于堆积作用及微生物的代谢活动, 曲房会维持一段时间的高温(45 $^{\circ}\text{C}$ 左右), 然后缓慢下降至环境温度, 此时期微生物代谢活动明显回升, 霉菌和酵母菌的检测数增加, 丰度值增加, 并略有波动。储藏后期, DGGE 图谱显示大曲丰度值又有所回升并保持稳定。

2.4 PCR - DGGE 图谱多样性指数分析

Shannon - Wiener 多样性指数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。通过比较大曲制备阶段真菌群落多样性指数的变化规律(图 3), 结果表明: 大曲样品真菌多样性指数在 1.449 13 ~ 2.679 之间。随发酵时间的增加, 大曲微生物的生物多样性指数先升高后降低, 然后又升高并基本保持稳定。

其中大曲培菌期(1 - 10 d)大曲样品多样性指数逐渐增加至较高的水平为 2.207, 这一时期是大曲的主发酵期, 水分活度高, 营养丰富, 品温逐渐升高, 微生物代谢

表 1 不同大曲样品真菌 18S rRNA 基因 PCR - DGGE 图谱的丰度及优势度

| 样品 | 1d | 5d | 10d | 20d | 30d | 40d | 50d | 60d | 70d | 80d | 90d | 100d |
|---------|--------|--------|-------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|-------|
| 丰度 | 6 | 14 | 13 | 7 | 9 | 8 | 10 | 10 | 8 | 15 | 17 | 16 |
| 优势度 (%) | | | | | | | | | | | | |
| 1 | / | / | 1.89 | 10.262 | 14.604 | 5.485 | 15.81 | 9.256 | 14.067 | 4.590 | 9.327 | 5.506 |
| 2 | / | 3.026 | 7.609 | // | 18.647 | 17.482 | 11.4 | 7.768 | 17.291 | 4.529 | 6.122 | 3.371 |
| 3 | / | / | / | / | / | / | 1.612 | / | / | 2.019 | 4.744 | 4.388 |
| 4 | / | / | 12.60 | / | 4.496 | 1.163 | / | 4.937 | / | / | 5.472 | 7.816 |
| 5 | / | 2.412 | 6.167 | / | / | / | / | / | / | 3.083 | 1.713 | 6.495 |
| 6 | / | / | / | 7.855 | 26.469 | 32.960 | 15.845 | 8.83 | 30.857 | 0.989 | 5.177 | 2.490 |
| 7 | / | 2.931 | 1.954 | / | 9.069 | / | / | 11.585 | / | 23.99 | 11.08 | 15.12 |
| 8 | 25.52 | 2.593 | / | / | / | / | / | / | / | 6.445 | 1.579 | 6.912 |
| 9 | / | / | / | / | / | / | / | / | / | 6.424 | 1.581 | 2.403 |
| 10 | 15.93 | 0.966 | 5.258 | 5.451 | / | / | 2.902 | / | / | 3.312 | 4.751 | 4.367 |
| 11 | 35.58 | 40.124 | 23.52 | / | / | / | 2.297 | 5.207 | 3.406 | 13.615 | 5.577 | 7.577 |
| 12 | 13.728 | 6.226 | 1.047 | / | / | / | / | 9.94 | | 3.490 | 4.100 | 8.880 |
| 13 | / | 13.496 | 19.93 | 12.556 | 4.173 | 5.527 | 28.21 | 16.785 | 18.268 | 19.41 | 3.296 | 11.89 |
| 14 | / | 2.761 | / | 52.251 | 7.908 | 25.649 | / | 5.207 | / | / | 4.173 | / |
| 15 | / | / | 0.791 | / | / | / | / | / | 1.071 | 4.303 | 11.079 | 1.637 |
| 16 | 2.531 | 5.866 | 8.459 | 11.435 | 8.637 | 9.421 | 12.097 | 10.94 | 6.031 | 0.630 | 10.960 | 8.96 |
| 17 | 7.728 | 13.50 | 5.439 | 0.191 | 5.997 | 9.421 | 7.063 | 5.822 | 3.509 | 0.356 | 8.236 | 9.885 |
| 18 | / | 1.04 | 5.341 | / | / | / | / | / | / | / | / | / |
| 19 | / | 2.073 | / | / | / | / | / | / | / | / | / | / |
| 20 | / | 13.46 | / | / | / | / | / | / | / | / | / | / |
| 21 | / | / | / | / | / | / | 2.765 | / | / | / | / | / |
| 22 | / | / | / | / | / | / | / | 3.724 | / | / | / | 3.669 |

注:“/”未检出

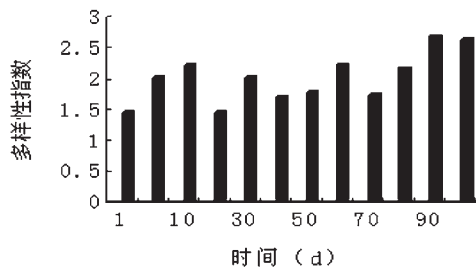


图 3 大曲制备过程真菌群落多样性指数变化规律

活跃,丰度和优势度都大幅增加,多样性指数不断增加,这一结果与罗惠波等利用 BIOLOG ECO 微平板分析浓香型大曲发酵过程中微生物群落代谢特性的结果相符合^[18]。发酵第 20 d 时,检出条代数减少,多样性指数降至最低点 1.452,可能是翻曲的原因。随后的第 30 d 又增加至 2.017,随后在一定范围内波动,但总体多样性指数呈上升趋势,随着发酵的进行和发酵条件的改变,不适应的真核微生物逐渐死亡淘汰,经过驯化后的真核微生物生存下来,并且保持一定的优势,直到储藏后期,逐渐趋于稳定,多样性指数稳定在 2.621 左右。总体而言,大曲经过培菌期和储藏期,多样性指数在一定范围内波动,特别是在大曲储存阶段还存在种群波动,进一步证实了大曲储存阶段的重要性。

2.5 PCR - DGGE 图谱相似性分析

通过聚类分析不同大曲真核微生物 18S rDNA PCR - DGGE 图谱的相似性(图 4)。

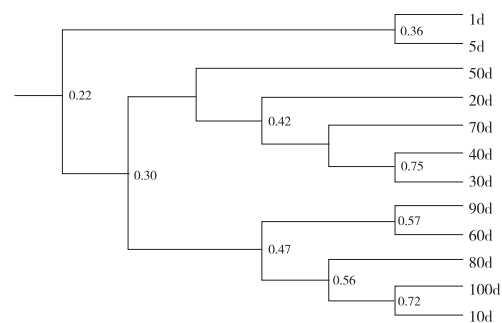


图 4 不同大曲样品真菌群落 UPGMA 聚类图

整个大曲发酵及储存过程中大曲样品可聚为三大类,其中培菌期第 1 d 和 5 d 天样品聚为一大支,说明这两个时期存在共同的真菌群落结构,但由于这一时期温度,水分等外界环境剧烈变化,导致与其它阶段真菌群落的差异较大;储藏前期第 20 d、30 d、40 d、50 d 样品聚为一大支,其中第 30 d、40 d 样品相似度达 0.75,说明这一时期真菌微生物组成随着发酵的进行,群落结构逐渐趋于稳定;第 60 - 100 d 样品聚为一大支,这一时期,除第 70 d 样品外,其他样品之间相似度是逐渐增加的,

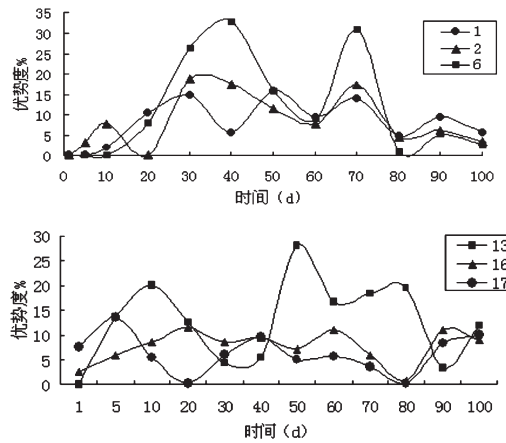
说明大曲真菌群落结构越来越稳定。其中第 10 d 与 100 d 的样品相似度达 0.72。总体而言,大曲制备过程中真菌群落结构变化较大,但相邻样品间相似度较高,表明大曲发酵过程中微生物此消彼长、相互影响、相互作用。

2.6 大曲制备过程真菌种群间相互作用关系

对于 DGGE 图谱中主要条带 1,2,6,13,16,17 优势度的变化规律的分析结果表明(表 1、图 4):第 16 号、17 号条带所代表的真菌类群在所有样品中均检出,发酵过程中分别达到最大优势度 12.097% 和 13.50%。且二者变化趋势较为相似,说明这两个条带所代表的真菌类群可能存在协同作用。13 号条带除在第 1 d 未检测外,在所有样品中均有检出,其优势度波动范围较大,发酵 50 d 优势度达到最高值 28.21%,之后呈下降趋势,最终稳定在较低水平。条带 13 号和条带 16 号、17 号所代表的真菌类群似乎存在着此消彼长的演替规律,因此三者之间可能存在某种代谢物的竞争或者代谢产物抑制物的关系;条带 1 号和 2 号培菌期中后期才开始检出,在大曲培养前期二者优势度变化呈相反状态,后期变化趋势相似,并且整个发酵期均保持一定优势;条带 6 号在储藏期才有检测,并在发酵 40 d 达到最大值 32.960%,由图 5 可知,条带 6 号和条带 2 号优势度变化趋势较为相似,且条带 6 号菌群的优势度远高于条带 2 号的菌群,说明二者所代表真菌的类群可能存在共生关系。而条带 7 号、8 号、10 号、11 号和 14 号所代表的真菌类群在样品总体中间歇检出,可能是由于部分样品 PCR 扩增的问题,未检出条带;条带 18 号、19 号和 20 号只在培菌期第 5 d 时检出,说明条带 18 号、19 号和 20 号所代表的真菌类群比较适合高温、高湿的生长环境,可能属于耐高温菌属,但在较低温度的环境不具竞争力,若对其进一步研究,可能具有较高的应用价值。对主体条带之间优势度的变化规律的比较,可在一定程度上反映出优势菌群之间的种群关系,最终可指导大曲的生产工艺。

3 结束语

本实验通过 PCR - DGGE 的方法对大曲发酵剂储存过程中真菌菌群的动态变化进行了解析,发现真核微生物菌群之间的联系比较密切,这可能与真核微生物代谢的复杂性以及大曲微生物特定的生长环境有关。储藏后期大曲品温逐渐接近环境温度,水分活度降低,营养物质及各种微量成分已大量消耗,传统研究认为,此时微生物类群,尤其是霉菌和酵母应逐渐降低,或保持



1,2,6,13,16,17 分别代表 DGGE 图谱上第 1 号、2 号、6 号、13 号、16 号、17 号条带。

图 5 大曲制备阶段主要真菌条带优势度变化规律

在较低水平。而由 DGGE 图谱显示,储藏后期真菌的检出条带数及丰度值却有较大幅度的回升,并达到最大值 17。故关于 PCR - DGGE 法分析大曲培养过程中真核微生物的消长规律,仍需进一步验证。

本研究后续将对 DGGE 图谱中出现的优势条带进行测序,更加详细的了解大曲发酵过程中真核微生物类群的变化规律;对优势条带对应菌群进行分离纯化,以更好的了解其在大曲发酵过程中的代谢机理及功能。

参考文献:

- [1] 沈怡方.试论浓香型白酒流派[J].酿酒,1992(6):10-13.
- [2] 李云英,李能树.大曲酒微生物区系的初步研究[J].生物学杂志,1996(3):19-21.
- [3] 车玉伶,王慧,胡洪营,等.微生物群落结果和多样性解析技术研究进展[J].生态环境学报,2005,14(1):127-133.
- [4] 高亦豹,王海燕,徐岩.利用 PCR-DGGE 未培养技术对中国白酒高温和中温大曲细菌群落结构的分析[J].微生物学通报,2010,37(7):999-1004.
- [5] 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):98-100.
- [6] 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,2007,57(7):37-39.
- [7] 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(2):38-41.
- [8] 乔宗伟.中国浓香型白酒窖池微生物区系解析[D].

- 成都:四川大学,2004.
- [9] 施思,王海英,张文学,等.浓香型白酒不同窖泥微生物群落特征分析[J].酿酒科技,2011(5):38-41.
- [10] 潘勤,春孟镇,钟其顶,等.河汾酒大曲细菌群落结构的 PCR-DGGE 分析[J].酿酒科技,2011(6):95-98.
- [11] 孟镇,熊正河,钟其顶,等.应用 PCR-DGGE 技术解析白酒大曲细菌群落结构[J].食品与发酵工业,2010,36(10):159-162.
- [12] 吴谋成.食品分析与感官评定[M].北京:中国农业出版社,2002.
- [13] 张春辉,赵树欣,梁慧珍.高温大曲中细菌总 DNA 提取方法比较[J].酿酒科技,2008(10):54-56.
- [14] 罗惠波,侯海波,黄治国,等.大曲真核微生物群落 PCR-DGGE 电泳条件优化[J].四川理工学院学报:自然科学版,2011,24(25):515-518.
- [15] 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.
- [16] 章肇敏,吴生文,林培.大曲培养过程中微生态变化规律的研究[J].酿酒科技,2011(11):19-22.
- [17] 王世宽,潘明,徐艳丽,等.浓香型大曲发酵过程中霉菌消长情况的研究[J].中国酿造,2010(1):42-45.
- [18] 万自然.大曲培养过程中微生物及酶的变化[J].酿酒科技,2004,857(7):25-26.
- [19] 黄治国,甄攀,罗惠波.浓香型大曲微生物群落代谢多样性研究[J].西南大学学报:自然科学版,2009,31(7):180-184.

Study on the Succession Law of Fungal Community During the Fermentation and Storage Process of Luzhou-flavor Daqu by PCR-DGGE

YE Guang-bin^{1,2}, LI Dan-yu¹, YANG Yue-huan¹, LUO Hui-bo^{1,2}, YANG Xiao-dong¹

(1. School of Biotechnology Engineering, Sichuan University of Science & Engineering, Zigong 643000, China;

2. Liquor Making Bio-technology & Application of Key Laboratory of Sichuan Province, Zigong 643000, China)

Abstract: 12 Daqu samples which were collected from Daqu fermentation process (0-10d) and storage process (20-100d) were selected as the study objects. The structure of fungal community structure during the preparation process of Luzhou-flavor Daqu was analyzed by PCR-DGGE. The analyzes of abundance, dominance and bio-diversity index of PCR-DGGE diagram show that during the Daqu preparation process, the fungal community structure is complicated. Dramatic changes of fermentation environment, as well as deposit coordination and restriction effect between different fungal communities, have influence on the composition of fungal microbial communities in Daqu preparation process.

Key words: Daqu; 18S rRNA gene; PCR-DGGE; PCR-DGGE; succession of microorganism