

智微园大学生科技服务团“协同育人”系列丛书

襄阳市浓香型白酒窖泥 微生物多样性研究

湖北文理学院智微园大学生科技服务团 编 著

西南交通大学出版社

· 成 都 ·

智微园大学生科技服务团“协同育人”系列丛书

襄阳市浓香型白酒窖泥微生物多样性研究

湖北文理学院智微园大学生科技服务团 编著

责任编辑	牛 君
封面设计	曹天擎
出版发行	西南交通大学出版社 (四川省成都市金牛区二环路北一段 111 号 西南交通大学创新大厦 21 楼)
发行部电话	028-87600564 028-87600533
邮政编码	610031
网 址	http://www.xnjdcbs.com
印 刷	成都勤德印务有限公司
成品尺寸	170 mm × 230 mm
印 张	6.5
字 数	111 千
版 次	2019 年 6 月第 1 版
印 次	2019 年 6 月第 1 次
书 号	ISBN 978-7-5643-6920-0
定 价	36.00 元

图书如有印装质量问题 本社负责退换

版权所有 盗版必究 举报电话：028-87600562

《襄阳市浓香型白酒窖泥微生物多样性研究》
指导教师团队名单

湖 北 文 理 学 院 郭 壮 张振东 赵慧君 侯强川
王 玉 荣 折米娜 王海燕 汪 娇
湖北古襄阳酒业有限公司 刘 平 刘文汇 杨少勇

资助项目：

湖北文理学院教师科研能力培育基金“双百行动计划”专项
(PYSB20181060)

湖北文理学院协同育人专项 (2018025)

《襄阳市浓香型白酒窖泥微生物多样性研究》

智微园大学生科技服务团参与人员名单

食品科学与工程 14 级	蔡宏宇	杨成聪			
食品科学与工程 15 级	沈馨	王丹丹	邹金	张毅	
食品质量与安全 15 级	杨小丽				
食品科学与工程 16 级	尚雪娇	董蕴	倪慧	周书楠	
	杨江	颜娜	望诗琪	吕虎晋	
	邓风	杨发容	许小玲	代程洋	
食品质量与安全 16 级	舒娜				
食品科学与工程 17 级	葛东颖	向凡舒	崔梦君	李娜	
	雷炎	马佳佳	张逸舒		

前 言

自 2013 年襄阳市委市政府从振兴襄阳白酒产业大局出发，拟优化整合资源，陆续出台有针对性的扶优做强政策，提出了力争襄阳白酒产业过百亿元，打造鄂酒除稻花香、白云边之外的湖北白酒“第三极”的行业发展目标。作为我国销量最大的白酒类型，浓香型白酒是以粮谷为主要原料，经传统固态法发酵、蒸馏、陈酿和勾兑而成。浓香型白酒的发酵主要在窖池中完成，窖泥微生物区系的形成和演变决定了产品的最终质量，因此对窖泥中微生物的群落结构进行解析则显得尤为重要。

根据《湖北文理学院“协同育人 337 工程”实施方案》和《湖北文理学院“双百行动计划”实施细则》，智微园大学生科技服务团与湖北古襄阳酒业有限公司合作，以“襄阳市浓香型白酒窖泥微生物多样性研究”为切入点，积极引导食品科学与工程、食品质量与安全专业本科生参与科研创新活动，在窖泥微生物多样性解析，窖泥微生物分离、鉴定、收集和保藏等方面取得了初步的研究成果。

本书将团队成员前期发表的学术论文集结成册，以便食品科学与工程类专业师生和襄阳市浓香型白酒酿造企业技术人员翻阅斧正。全书共分 7 章，第 1 章为白酒窖泥微生物多样性研究方法及进展，第 2 章为基于 Miseq 高通量测序技术古襄阳酒窖泥细菌多样性评价，第 3 章为丢糟窖窖泥细菌多样性评价，第 4 章为退化和正常窖泥微生物多样性的比较分析，第 5 章为基于 DGGE 的窖泥细菌与乳酸菌多样性研究，第 6 章为浓香型白酒窖泥中乳酸菌的分离及其

在柑橘酒中的应用，第7章为襄阳浓香型白酒窖泥中乳酸菌分离株目录。

本书的出版得到了湖北文理学院科学技术处“双百行动计划”专项和湖北文理学院教务处协同育人专项经费资助，在此我们表示感谢。

编 者

2018年11月

目 录

第 1 章	白酒窖泥微生物多样性研究方法及其进展	001
1.1	传统纯培养方法及其在窖泥微生物研究中的应用	001
1.2	PLFA 技术及其在窖泥微生物研究中的应用	003
1.3	克隆文库技术及其在窖泥微生物研究中的应用	003
1.4	PCR-DGGE 技术及其在窖泥微生物研究中的应用	004
1.5	第二代测序技术及其在窖泥微生物研究中的应用	007
1.6	第三代测序技术简介	009
1.7	宏基因组技术及其在窖泥微生物研究中的应用	010
1.8	展 望	011
第 2 章	基于 Miseq 高通量测序技术古襄阳酒窖泥细菌多样性评价	019
2.1	材料与amp;方法	020
2.1.1	材料与试剂	020
2.1.2	仪器与设备	020
2.1.3	实验方法	020
2.2	结果与分析	022
2.2.1	序列丰富度和多样性分析	022
2.2.2	基于各分类学地位窖泥细菌相对含量的分析	024
2.2.3	窖泥中乳酸菌的分离及鉴定	027
2.3	结 论	028
第 3 章	丢糟窖窖泥细菌多样性评价	031
3.1	材料与amp;方法	031
3.1.1	材料与试剂	031
3.1.2	仪器与设备	032
3.1.3	实验方法	032

3.2	结果与分析	034
3.2.1	序列丰富度和多样性分析	034
3.2.2	基于各分类学地位丢糟窖窖泥细菌相对含量的分析	036
3.2.3	丢糟窖窖泥微生物群落结构的研究	039
3.2.4	丢糟窖窖泥中乳酸菌菌株的分离鉴定	040
3.3	讨论与结论	041
3.3.1	丢糟窖窖泥中的乳酸菌	041
3.3.2	影响窖泥细菌多样性的因素	042
3.3.3	丢糟窖窖泥微生物多样性研究的实际意义	042
3.3.4	本实验的结论与不足	042
第 4 章	退化和正常窖泥微生物多样性的比较分析	046
4.1	材料与amp;方法	047
4.1.1	材料与仪器	047
4.1.2	实验方法	047
4.2	结果与分析	049
4.2.1	序列丰富度和多样性分析	049
4.2.2	基于各分类学地位相对含量的 2 类窖泥细菌构成研究	050
4.2.3	基于多元统计学分析的 2 类窖泥细菌群落结构的研究	053
4.2.4	关键细菌类群的甄别	055
4.3	讨论与结论	056
第 5 章	基于 DGGE 的窖泥细菌与乳酸菌多样性研究	062
5.1	材料与amp;方法	063
5.1.1	材料与试剂	063
5.1.2	仪器与amp;设备	064
5.1.3	实验方法	064
5.2	结 果	066
5.2.1	新窖与老窖窖泥的细菌群落结构解析	066
5.2.2	新窖与老窖窖泥的乳酸菌群落结构差异分析	068
5.2.3	新窖与老窖窖泥的乳酸菌群落结构解析	070
5.3	结 论	073

第 6 章 浓香型白酒窖泥中乳酸菌的分离及其在柑橘酒中的应用	076
6.1 材料与方法	077
6.1.1 材料与试剂	077
6.1.2 仪器与设备	077
6.1.3 实验方法	078
6.2 结果与分析	080
6.2.1 乳酸菌形态学观察及 16S rDNA 同源性分析	080
6.2.2 窖泥乳酸菌菌株酒精耐受性的测定	081
6.2.3 橘子酒滋味品质的评价	082
6.3 结 论	085
第 7 章 襄阳浓香型白酒窖泥中乳酸菌分离株目录	087
附录 MRS 培养基配方	094



第1章 白酒窖泥微生物多样性 研究方法及其进展

白酒是中国特有的一种蒸馏酒，由于白酒的酿造工艺、生产环境以及酒曲制作方式的不同，形成了浓香型、酱香型、清香型、米香型等主要香型白酒，还由此衍生出兼香型等多种类型^[1]。浓香型白酒以粮谷为主要原料，经传统固态法发酵，蒸馏，陈酿，勾兑而成，以己酸乙酯为主体复合香，是我国销量最大的白酒类型^[2]。浓香型白酒使用泥窖发酵，窖池的优劣对浓香型白酒生产至关重要，以优质老窖养老糟才能生产好酒。上千年的驯化与自然选择，孕育了知名酒厂酒窖中独特的微生物区系，它们相互共生，相互竞争，通过复杂的相互作用关系，形成了一个稳定的生态群体。窖泥是白酒固体发酵过程中微生物的重要来源，是影响白酒的口感与品质的重要因素^[3-4]。因此，对窖泥中微生物的研究意义不言而喻。

近几十年来，科技不断进步，窖泥中的微生物研究技术手段也在不断推陈出新。首先是不依赖于聚合酶链式反应（Polymerase chain reaction, PCR）的传统的培养方法、磷脂脂肪酸（Phospholipid fatty acid, PLFA）以及荧光原位杂交（Fluorescence in situ hybridization, FISH）等方法。然后是基于PCR的宏基因组研究策略如克隆文库、变形梯度凝胶电泳（Denaturing gradient gel electrophoresis, DGGE）以及目前研究的主流——第二代测序技术，也是目前窖泥微生物研究的主要方法。本文将对浓香型白酒窖泥微生物研究中常用的技术方法进行介绍，并介绍它们在白酒窖泥微生物研究中的应用进展。

1.1 传统纯培养方法及其在窖泥微生物研究中的应用

纯培养技术是最早应用于微生物群落结构的研究手段，主要是使用不同营养成分的培养基对环境样品中微生物进行分离，然后根据微生物

的菌落形态、生理生化来确定微生物的分类情况。后来引入了分子生物学方法后,对所分离的纯培养原核微生物的 16S rDNA^[5-6]基因和真菌微生物的 26S rDNA 或者 ITS (Internal transcribed spacer)^[7] 间区序列对微生物进行分类,以此获取微生物的群落结构信息。

以纯培养方法对窖泥中的微生物进行研究由来已久。但是由于自然环境中仅有 0.1%~10% 的微生物可以被培养分离,采用传统的纯培养方法容易导致目标环境中大量微生物无法培养,从而造成对样品中微生物多样性的低估。以岳元媛等的研究为例:采用厌氧培养方法对窖泥中的细菌进行了筛选分离,共得到 8 个属的细菌,分别是芽孢杆菌属、假单胞菌属、梭菌属等,绝大多数为兼性厌氧细菌,梭菌属细菌仅占 1% 左右^[7],这与采用未培养技术得到的结果大相径庭。

尽管传统纯培养技术具有许多局限性,但是该技术到现在仍在被广泛使用。这主要是由于该技术是研究特定种类的微生物生理生化特征,并将一些微生物应用于工业化的重要方法。科研人员也对传统纯培养技术进行了改进^[8-9]:模拟自然环境,在分离海洋细菌时,使用海水配制培养基;改善培养条件,在培养厌氧细菌时,使用厌氧工作站;使用共培养技术,将共栖的两种或者数种微生物一起培养等,但是仍然达不到未培养方法对样品中微生物多样性研究的效果,因此发展起来了多种不依赖于传统培养技术的方法。

目前采用传统纯培养技术对窖泥中的微生物研究,多集中在梭菌属。最初对白酒窖泥中的微生物研究发现,在这些复杂多样的微生物中,有一种呈鼓槌状的产芽孢杆菌(梭菌),能以乙醇、乙酸经丁酸合成己酸,这类微生物被称为己酸梭菌。1942 年,该菌被命名为 *Clostridium kluyveri*^[10]。自从 1964 年己酸乙酯作为白酒中的香气成分被发现以来,己酸菌在白酒发酵过程中的作用逐渐被人们认识到,优质的己酸菌被发掘出来,如内蒙 30、黑轻 80 等,黑轻 80 己酸产量为约 380 mg/100 mL^[11]。学者对典型的浓香型白酒如泸州老窖^[12]、五粮液酒业^[13]、安徽金种子酒业^[14]、江苏汤沟酒业^[15]等窖池窖泥中己酸菌进行了大量的研究工作,收集到了不少品质优良,己酸产量高的菌株,最高己酸产量可达 4.36 g/L。己酸细菌是窖泥微生物的研究中最重要的发现之一,其含量是评估窖泥质量的基础。优质的己酸菌被用于退化窖池的养护^[16-17],还被用于生产人工窖泥^[18]。使用己酸菌制作的人工窖泥在短期内就可生产出优质酒,打破了非 50 年老窖不能生产名酒的说法。



1.2 PLFA 技术及其在窖泥微生物研究中的应用

泸州老窖是国内浓香型白酒的典型代表，保存有入选吉尼斯世界纪录、拥有 400 多年窖龄、国内最古老的白酒窖池。对窖泥微生物多样性报道最多的当属对泸州老窖酒业的窖泥研究，研究方法集中在了 PLFA、克隆文库、PCR-DGGE (Polymerase chain reaction-denaturing gradient gel electrophoresis) 及第二代测序技术。

磷脂脂肪酸是生物细胞膜的主要成分，仅存在于活细胞膜中，当微生物死亡后，脂肪酸就会被代谢掉。细胞中包含脂肪酸的脂类物质主要有碳水化合物、脂性醇、磷脂、糖脂和中性脂等^[19]。通常这些脂类物质在同一种微生物中是稳定的，并且操作难度与试验条件要求较低，因此 PLFA 指纹图谱技术被开发出来，在对窖泥、土壤、食品等多种环境的微生物的研究中得到应用^[19-21]。Tunlid 在 1985 年首次利用磷脂脂肪酸技术对油菜根际微生物的群落结构进行了研究，此后该技术逐渐被引入其他的微生物研究领域。窖泥是一种特殊的土壤，因此在窖泥微生物的研究中也引入了磷脂脂肪酸技术。刘琨毅^[21]等对窖泥微生物的分析表明，厌氧革兰氏阳性菌和真菌是窖泥中的优势菌群，不同窖龄窖泥中的微生物 PLFA 含量不同，300 年窖龄中 PLFA 含量大于 5 年与 100 年窖龄^[22]。但是另一研究报道了泸州老窖 20、50、100、200、300 年窖泥中革兰氏阴性菌、革兰氏阳性菌与需氧菌的比例并无显著差异^[23]。

总体来说，PLFA 技术不依赖于分离和培养的技术，更为快速、简便，操作难度更低，但是磷脂脂肪酸分析方法不能对微生物在种或菌株水平上加以区分^[25]，所以常与其他分析技术，如 DGGE 或传统培养方法相结合，用于的窖泥微生物研究。

1.3 克隆文库技术及其在窖泥微生物研究中的应用

克隆文库是 20 世纪末在对微生物多样性的研究中被开发出来。通过构建克隆文库分析微生物群落时，首先要获得样品总 DNA，以提取到的

总 DNA 为模板 PCR 扩增微生物的 16S rDNA 基因,然后将得到的扩增产物与载体连接,转化感受态细胞,通过蓝白斑筛选,挑取阳性克隆进行测序,根据测序结果判断样品中的微生物信息^[25-27]。这一方法最早在 1991 年被 Giovannoni 等用来分析浮游细菌多样性^[28]。由于克隆文库法针对原核微生物的 16S rDNA 全长,且避开了传统的纯培养方法,能将一些对营养要求苛刻的微生物鉴定出来,因此能更全面地反映样品中的微生物多样性;由于采用该方法能几乎获取微生物的 16S rDNA 全序列,所以结果也更加准确,被用于白酒窖泥微生物的研究。

2013 年,刘森等^[25]采集了四川一浓香型白酒公司 20 年窖池窖泥样品,从窖池上层窖泥中检测到 *Clostridium*、*Lactobacillus* 两个菌属,中层检测到 5 个菌属,分别是 *Lactobacillus*、*Serratia*、*Clostridium*、*Bacillus*、*Caloramator*,窖池下层检测到 4 个菌属,分别是 *Lactobacillus*、*Clostridium*、*Bacillus*、*Caloramator*,发现窖池不同位置的微生物分布显著不同。在所有样品中,*Clostridium* 与 *Lactobacillus* 菌属在各层样品中均占 20%以上,为优势菌属。2014 年^[28],同样采用克隆文库法对安徽金种子酒业的浓香型白酒窖泥微生物进行了解析,发现退化窖泥中优势菌门为 Firmicutes 与 Bacteroidetes,而老窖泥中 Firmicutes 与 Chloroflexi 为优势菌门。尽管通过克隆文库法对窖泥的研究取得了一些成果,但是由于该法操作繁琐,且耗时耗力,因此已逐渐被 DGGE 与二代测序技术取代,很少出现在近几年的研究报道中。

1.4 PCR-DGGE 技术及其在窖泥微生物研究中的应用

DGGE 技术能用于环境中细菌、蓝细菌、古菌、微型真核生物、真菌生物和病毒群落的生物多样性的分析,目前主要研究对象是原核微生物及真菌微生物。原理是在聚丙烯酰胺凝胶基础上,加入了变性剂(尿素和甲酰胺)使聚丙烯酰胺凝胶从上到下呈现从小到大的变性梯度,PCR 产物沿着化学梯度有不同解链行为,在凝胶的不同位置上停止迁移而分离开来^[29]。PCR-DGGE 分析微生物多样性的试验流程为:首先是样品总 DNA 的提取;然后以总 DNA 为模板进行 PCR 扩增;制作相应梯度的聚

丙烯酰胺凝胶,然后在样品孔添加样品的 PCR 产物进行聚丙烯酰胺凝胶电泳;对聚丙烯酰胺胶进行染色,挑取条带回收,克隆与测序,对聚丙烯酰胺胶进行分析^[29-30]。

细菌 16S rDNA 基因含有多个可变区与保守区^[5](图 1-1),由于 DGGE 对大于 500 bp 的 DNA 片段分离度较差,通常使用 16S rDNA 基因中的一个或者两个区段。由于 PCR-DGGE 技术不需要培养,检测快速,成本低,目前仍然与第二代测序技术同为当前白酒窖泥中微生物研究的主要技术。自从 1993 年, Muyzer^[30]第一次将 PCR-DGGE 技术引入微生物多样性的研究以后,该技术就在与微生物相关的各个领域得到广泛应用,在白酒窖泥微生物的研究也引入了 PCR-DGGE 技术(表 1-1),且成为白酒窖泥研究的主要研究方法。

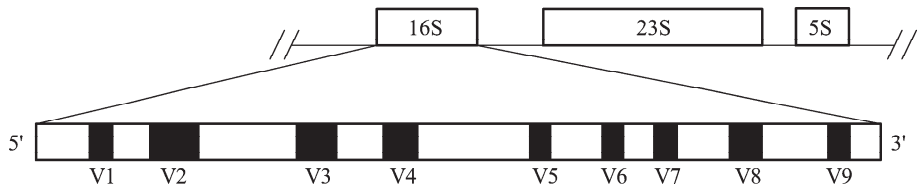


图 1-1 细菌 16S rDNA 基因结构^[5]

表 1-1 白酒窖泥中微生物的研究方法

技术方法	样品特点	作者/年份/来源
DGGE	泸州老窖 20、100、200、300 年窖泥	Deng B, Shen C H, Shan X H, et al. 2012 ^[31]
RFLP	泸州老窖 20、40、100、400 年窖泥	吴英英. 2013 ^[32]
DGGE 与 PLFA	泸州老窖 20、50、100、200 和 300 年窖泥	Zheng J, Liang R, Zhang L Q, et al. 2013 ^[24]
Roche 454	内蒙古河套酒业发酵 0 d、10 d、20 d、30 d 窖泥	王福桢. 2014 ^[33]
DGGE	泸州老窖 1、2、3、4 年窖龄人工窖泥	Ding X F, Wu C D, Huang J, et al. 2014 ^[34]
DGGE	泸州老窖窖泥	Hu X L, Wang H Y, Wu Q, et al. 2014 ^[35]