

酱香型与清香型白酒发酵过程中乳酸菌菌群的差异性分析

吴莉莉 王海燕 徐岩* 王栋

(工业生物技术教育部重点实验室 食品科学与技术国家重点实验室
江南大学 生物工程学院 江苏 无锡 214122)

摘要: 【目的】为认识乳酸菌在中国白酒酿造过程中的作用与影响, 分析、比较了酱香型与清香型白酒发酵过程中乳酸菌的菌群结构及其差异。【方法】运用 PCR-DGGE 技术分析酱香型与清香型白酒发酵过程中乳酸菌群的演变规律。并利用传统微生物分离筛选方法进一步确定酱香型白酒发酵中的主要乳酸菌种。【结果】DGGE 图谱表明, 白酒发酵过程中的主要乳酸菌种是乳杆菌。但两种香型白酒发酵过程中乳酸菌群组成及动态变化均呈现出明显的差异。清香型白酒酒醅中 *Lactobacillus fuchuensis* 是优势菌种, 而酱香型白酒发酵中检测到多种含量较高的乳酸菌种。利用 MRS 培养基从酱香型白酒酒醅中共筛选获得 5 种乳酸菌种。通过两种方法, 确定 *Lactobacillus homohiochii* 是酱香型白酒发酵过程中含量最高的乳酸菌。【结论】深入研究白酒发酵过程中乳酸菌的组成及分布规律, 对于更好地认识中国白酒酿造中主要的细菌类群——乳酸菌的作用, 具有重要的理论意义和实践价值。

关键词: 酱香型, 清香型, 乳酸菌, PCR-DGGE, 菌群结构, MRS 培养基

基金项目: 国家自然科学基金项目(No. 31000806); 江苏省产学研前瞻性联合研究项目(No. BY2010116); 中国白酒 169 计划; 国家 863 计划项目(No. 2012AA021301)

*通讯作者: Tel: 86-510-85918201; 信箱: yxu@jiangnan.edu.cn

收稿日期: 2013-01-09; 接受日期: 2013-03-05

Differences of lactic acid bacteria community between soy sauce aroma style and light aroma style liquor fermentation

WU Li-Li WANG Hai-Yan XU Yan* WANG Dong

(Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, State Key Laboratory of Food Science and Technology, School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi, Jiangsu 214122, China)

Abstract: [Objective] In order to understand the functions of lactic acid bacteria (LAB) in the production of Chinese liquor, differences of LAB community in liquor brewing between soy sauce aroma style and light aroma style were analyzed. [Methods] PCR-DGGE was used to analyze LAB community during the liquor fermentation of soy sauce aroma style and light aroma style. The main LAB in the fermented grains of soy sauce aroma style were identified through culture-dependent method. [Results] DGGE profiles showed that *Lactobacillus* was the main LAB in liquor brewing. However, LAB community structure during the fermentation process of two style liquor appeared different succession rules. *Lactobacillus fuchuensis* was the dominant species in the fermented grains of light aroma style. And several LAB species with relatively high percentage were detected in soy sauce aroma style by culture-independent method. Five species were isolated from the fermented grains of soy sauce aroma style using MRS media. Results of two methods proved that *Lactobacillus homohiochii* was predominant in the brewing process of soy sauce aroma style. [Conclusion] This work explored LAB community structure in the fermentation process of Chinese liquor, which would be helpful to scientifically understand the important roles of LAB in the liquor production.

Keywords: Soy sauce aroma style, Light aroma style, Lactic acid bacteria, PCR-DGGE, Community structure, MRS media

乳酸菌是中国白酒酿造工业中一类非常重要的菌群。在发酵中后期,由于大部分微生物不能耐受高酸度、高乙醇浓度、低含氧量等不利条件而衰亡,乳酸菌成为绝对优势的细菌。但目前,对乳酸菌在中国白酒酿造中的结构组成及功能缺乏全面的研究。

乳酸菌被广泛应用于生产乳制品、肉制品、蔬菜制品、酒精饮料等发酵食品中。乳酸菌能利用可发酵性糖产生乳酸、乙酸等有机酸赋予产品特殊的风味特点^[1];通过改变发酵体系的 pH 值

或产生抗菌素抑制杂菌的生长,延长产品的保质期^[1];产生丰富的酶系(如蛋白酶、淀粉酶)^[1],对食品中风味物质的形成起着至关重要的作用;乳酸菌与其他微生物的相互作用会影响微生物的群落结构,从而改变了相关代谢成分的含量,最终影响产品的品质与口感^[2]。

传统观点认为,乳酸菌对中国白酒的贡献较小,对乳酸菌的关注主要体现在控制其在发酵过程中的数量,使乳酸和乳酸乙酯的含量保持在适当的比例,从而保证出酒率以及酒体风格口感的

稳定。而且乳酸菌大多是兼性厌氧或绝对厌氧菌,营养条件较为苛刻,给分离筛选工作带来了很大的困难。两方面原因导致目前对白酒中乳酸菌的研究甚少,仅仅是运用传统微生物分离筛选的方法从白酒发酵体系中筛选部分乳酸菌种,进而对其进行简单的形态特征描述、分类和发酵产酸等一些生理生化特性的研究^[3-4]。

中国白酒四大基本香型中,酱香型白酒的乳酸含量最高,而清香型白酒中乳酸含量偏低,但主体香味组分——乳酸乙酯含量为最高^[5]。虽然折算后酱香型与清香型白酒发酵过程中产生的乳酸皆较高,但不同的酿造工艺会使两种香型白酒发酵过程中形成不同的乳酸菌组成,最终影响产品的整体风格和口感。本研究运用 PCR-DGGE 技术比较酱香型白酒和清香型白酒发酵过程中乳酸菌的组成及差异,并用传统微生物分离筛选方法进一步确定酱香型白酒中重要的乳酸菌菌种,为今后深入探究乳酸菌在酱香型白酒发酵过程中的作用与影响提供重要依据。

1 材料与amp;方法

1.1 材料

1.1.1 样品:酱香型样品为贵州白酒厂酱香型白酒发酵 0、5、10、15、20、25 和 30 d 的酒醅,取样时间为 2012 年 3 月;清香型样品为山西白酒厂清香型白酒发酵 0、5、10、15、20、25 和 30 d 的酒醅,取样时间为 2011 年 6 月。样品密封后,-20 °C 冷冻保藏备用。

1.1.2 药品:MRS 培养基(Oxoid); dNTPs、*Taq* 酶、连接试剂盒购自 TaKaRa 公司; PCR 所用引物均由上海生工生物工程公司合成; SYBR Green I 购自 Invitrogen 公司; IPTG、X-gal 以及饱和酚溶液购自上海生工生物工程公司。

1.1.3 主要仪器和设备:PCR 仪,变性梯度凝胶电泳仪(DGGE),凝胶成像系统购自 Bio-Rad 公司;

厌氧培养箱(BUG BOX)购自华粤行仪器有限公司;真空冷冻干燥箱(DZF-6050B)购自上海一恒科技有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 样品预处理以及总 DNA 的提取:参照文献[6]。

1.2.2 PCR 扩增条件:选用乳酸菌(乳杆菌属、片球菌属、明串珠菌属以及魏斯氏菌属)特异性引物 Lac1 和 Lac2GC^[7]对样品基因组扩增。Lac1: 5'-AGCAGTAGGGAATCTTCCA-3'; Lac2GC: 5'-CGCCCGGGGCGCGCCCGGGGCGGCCCGGGG GCACCGGGGGATTTCACCGCTACACATG-3' (40 个 GC 夹子)。PCR 反应的 50 μL 体系包括: 5 μL 10×Buffer, 4 μL dNTPs 混合物, 1 U *Taq* 酶, 每种引物 25 pmol, DNA 模板约 10 ng。PCR 的反应程序: 94 °C 4 min; 94 °C 1 min, 55 °C 1 min, 72 °C 1 min, 共 30 个循环; 72 °C 10 min。

1.2.3 变性梯度凝胶电泳(DGGE)分析条件:丙酰胺凝胶浓度为 8%, 100%变性剂为 7 mol/L 尿素和 40%去离子甲酰胺, PCR 产物上样量为 200 ng。DGGE 变性梯度为 25%–45%, 电压 100 V, 电泳温度 60 °C, 电泳时间 200 min。电泳结束后用 SYBR Green I (30 mL TAE 缓冲液中加入 3 μL SYBR Green)染色 3 次, 每次 15 min。通过凝胶成像系统(Bio-Rad)分析电泳结果。

1.2.4 DGGE 条带测序:将优势微生物对应的条带切胶回收, 重新 PCR 扩增、连接 T 载体、转化、挑取阳性克隆子, 将阳性克隆子重新 DGGE 比对分析, 测序鉴定。详细参照文献[8]。

1.2.5 样品中乳酸菌的分离:称取 5 g 酒醅于装有 100 mL 生理盐水的三角瓶中, 然后置于 37 °C、200 r/min 摇床振荡混匀 30 min, 再 10 倍稀释涂布于 MRS 培养基, 取 10⁻¹、10⁻²、10⁻³ 3 个稀释度, 每个稀释度取 2 个平行样, 置于 37 °C 厌氧箱培养 48 h。依据菌落形态随机挑选菌种进行分离、纯化以及测序。将测序序列提交至

GenBank 数据库, 获取登录号。

2 结果与讨论

2.1 酱香型和清香型白酒发酵过程中乳酸菌群结构的分析

提取酒醅样品基因组总 DNA, 利用乳酸菌特异性引物 PCR 后获得约 350 bp 的 DNA 片段, 将 PCR 产物进行 DGGE 电泳, 分析酱香型和清香型白酒发酵过程中乳酸菌的菌群结构。由 DGGE 图谱(图 1、2)可见, 两种香型白酒发酵过程中乳酸菌群的多样性均较高, 但发酵过程中乳酸菌群组成及动态变化呈现出明显的差异。

用 Quantity One 软件将不同泳道中的 DNA 条带数量、胶中位置和条带亮度转化为数据矩阵, 采用主成分分析(Principal components analysis, PCA)法分析在不同发酵阶段乳酸菌区系的演变趋势(图 3)。清香型白酒在整个发酵过程中乳酸菌群相对集中, 发酵 15 d 后乳酸菌群组成基本保持稳定不变。但酱香型白酒在发酵前 5 天乳酸菌区系改变巨大, 此后随着发酵进程而不断变化、调

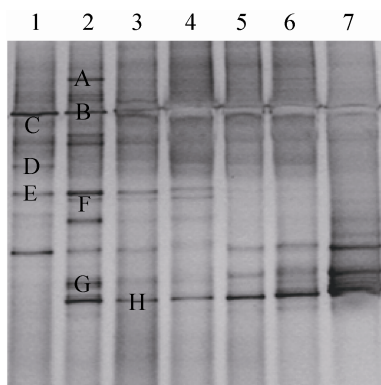


图 1 酱香型白酒酒醅中乳酸菌群落结构的 DGGE 电泳图

Fig. 1 DGGE profiles of LAB community structure in the fermented grains of soy sauce aroma style liquor

注: 1-7: 酱香型白酒发酵 0, 5, 10, 15, 20, 25 以及 30 d 的酒醅样品。

Note: 1-7: Samples that fermented 0, 5, 10, 15, 20, 25 and 30 days, respectively.

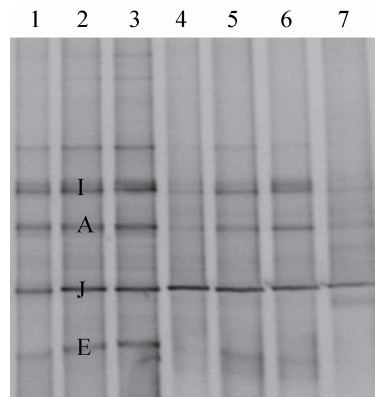


图 2 清香型白酒酒醅中乳酸菌群落结构的 DGGE 电泳图

Fig. 2 DGGE profiles of LAB community structure in the fermented grains of light aroma style liquor

注: 1-7: 清香型白酒发酵 0, 5, 10, 15, 20, 25 以及 30 d 的酒醅样品。

Note: 1-7: Samples that fermented 0, 5, 10, 15, 20, 25 and 30 days, respectively.

整着, 发酵 20 d 后保持稳定不变。

2.2 DGGE 图谱中主要条带的序列比对分析结果

对 DGGE 电泳图谱中 10 个主要的 DNA 条带进行切胶回收, 用 Lac1 和 Lac2GC 引物重新 PCR 扩增、克隆转化、再次 DGGE 验证阳性克隆、测序比对正确的阳性克隆子。测序结果经过 GenBank BLAST 比对分析后, 相似性均大于 99% (表 1)。鉴定出的 10 种乳酸菌中, 9 种都是 *Lactobacillus*, 只有 1 种是 *Pediococcus*。两种香型白酒发酵体系中所共有的乳酸菌种是 *Lactobacillus brevis* 和 *Lactobacillus buchneri*, 但这两种乳酸菌在不同香型白酒发酵体系中的相对丰度以及在发酵过程中的动态消长规律不相同。

Lactobacillus homohiochii、*Lactobacillus casei* 以及 *Lactobacillus paracasei* 在酱香型白酒酒醅中相对丰度较高, 是发酵过程中的优势菌群; 在酱

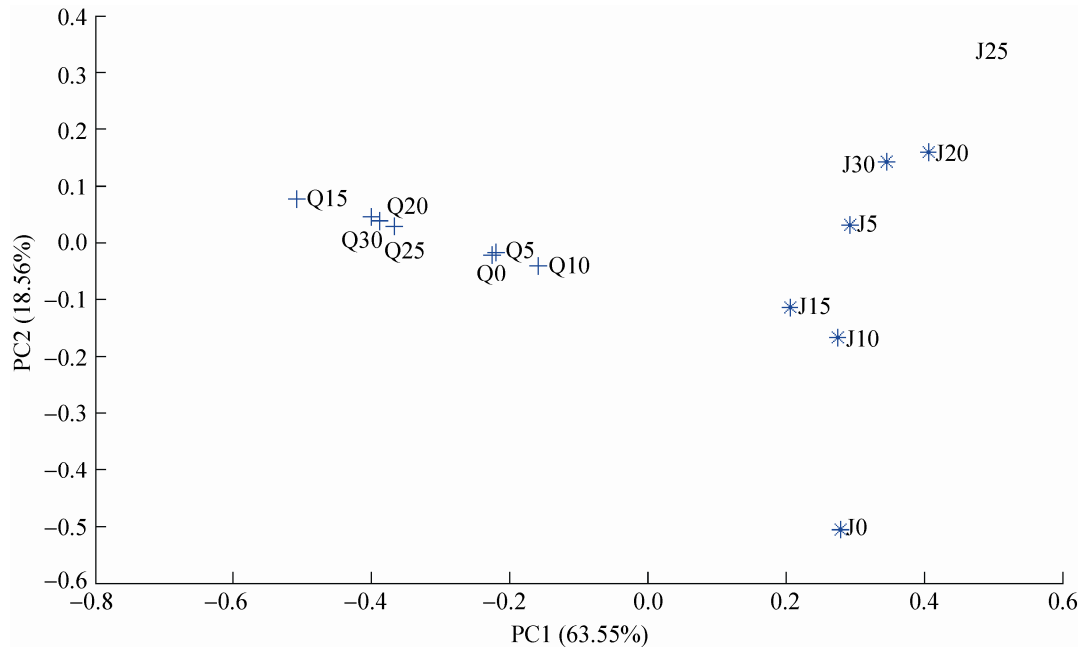


图3 酱香型与清香型白酒发酵过程中乳酸菌菌群 DGGE 电泳图谱的 PCA 分析

Fig. 3 PCA analysis of LAB community structures in the brewing process of soy sauce aroma style and light aroma style
 注: J0–J30: 酱香型发酵 0、5、10、15、20、25 以及 30 d 的酒醅样品; Q0–Q30: 清香型发酵 0、5、10、15、20、25 以及 30 d 的酒醅样品。

Note: J0–J30: Samples of soy sauce aroma style that fermented 0, 5, 10, 15, 20, 25 and 30 days, respectively; Q0–Q30: Samples of light aroma style that fermented 0, 5, 10, 15, 20, 25 and 30 days, respectively.

表1 PCR-DGGE 切胶条带的测序结果
 Table 1 Sequencing results of the bands cut from DGGE gels

条带 Band	菌株 Closest relative	相似性 Identity (%)
A	<i>Lactobacillus brevis</i> (JN792500.1)	99
B	<i>Lactobacillus homohiochii</i> (AB680370.1)	99
C	<i>Lactobacillus acetotolerans</i> (FR683099.1)	99
D	<i>Lactobacillus zymae</i> (AB626071.1)	99
E	<i>Lactobacillus buchneri</i> (JF520627.1)	99
F	<i>Pediococcus parvulus</i> (EU331259.1)	99
G	<i>Lactobacillus paracasei</i> (JF520605.1)	99
H	<i>Lactobacillus casei</i> (EU755260.1)	99
I	<i>Lactobacillus plantarum</i> (JN786879.1)	99
J	<i>Lactobacillus fuchuensis</i> (JF756333.1)	99

注: 表中测序比对结果均为 GenBank 比对后出现的第一个比对结果; A–J: DGGE 图谱中对应的条带。

Note: The result of sequence analysis was obtained as the first result of GenBank alignment list. A–J: The bands marked in DGGE profiles.

香型白酒发酵 0–15 d 能检测到一定量的 *L. buchneri* 和 *P. parvulus*。其余乳酸菌种含量较少, 仅能在发酵中部分时间点被检测到。

L. fuchuensis 是清香型白酒发酵体系中的优势菌种, 在整个发酵过程中, 相对含量始终保持在较高的水平。*L. plantarum* 以及 *L. brevis* 是第二大优势菌群, 几乎在整个发酵过程中可以检测到, 但出缸的酒醅中这两种乳酸菌相对含量很低。*L. buchneri* 仅在发酵前期可以被检测到。

2.3 MRS 培养基分离筛选酱香型白酒酒醅中的乳酸菌

酱香型与清香型白酒发酵过程中乳酸菌种类与比例的不同, 导致了这两种香型白酒中的乳酸及酸类物质组成的差异。根据 DGGE 的分析结果, 酱香型白酒发酵体系中存在多种相对丰度较高的乳杆菌。为进一步确定酱香型白酒发酵体系中

的优势乳酸菌种, 选用筛选乳杆菌的通用培养基——MRS 培养基分离酱香型白酒酒醅中的乳酸菌。

在厌氧、37 °C 的条件下培养 48 h 后, MRS 培养基上的菌落形态相近, 为白色、圆形、表面光滑平坦或微凸、边缘较整齐。共筛选获得 200 株菌, 进行 16S rRNA 基因序列测定。将测序结果进行同源性分析后, 按照序列相似性大于 98% 的标准, 把所有的测序结果分成若干个 OTU。

将每个 OTU 的代表序列提交至 GenBank 数据库, 进行 BLAST 比对, 并下载相似度最高的相关菌株的 16S rRNA 基因序列, 构建系统进化树(图 4)。按照 16S rRNA 基因序列相似性大于 98% 的菌株归于同一物种的原则, 分离得到的菌株可以归为 5 个菌种。分离得到的菌种主要为乳杆菌, 其中 *L. homohiochii* 和 *L. buchneri* 数量最多, 各占 40%, 其余的乳杆菌数量较少, 同时分离得到 *P. parvulus*。

2.4 白酒发酵过程中乳酸菌的功能初步分析

酱香型、清香型白酒发酵体系中检测到的乳酸菌也广泛存在于传统发酵食品中, 这些菌种在其他发酵食品中的作用可以为判断其在白酒发

酵体系中的功能提供依据。*L. homohiochii* 属于同型发酵乳酸菌, 有研究发现其在香肠制品发酵中能合成胞外蛋白酶, 加速蛋白质大分子物质的水解, 促进氨基酸等小分子风味物质的形成^[9]。

L. buchneri 是异型发酵乳酸菌, 在厌氧、低 pH (小于 5.8) 条件下可以将乳酸转变为乙酸和 1,2-丙二醇, 每摩尔的乳酸可以生成大约 0.5 mol 的乙酸^[10], 而乙酸对腐败微生物的抑制作用比乳酸更强; 某些发酵食品中, 如奶酪制品, 部分 *L. buchneri* 菌株具有组氨酸脱羧酶活性, 与组胺的形成有关^[11]。*L. casei* 和 *L. paracasei* 是发酵奶制品中的益生菌, 属于兼性异型发酵乳酸菌, 具有很强的耐酸性, 能够产生有机酸如乳酸、乙酸、丙酸以及分泌抑菌肽类物质(细菌素)抑制人体肠道中致病菌的生长^[12]; *L. casei* 部分菌株能够产生酯酶、蛋白酶^[13]等多种酶促进大分子物质的降解, 从而有利于小分子营养物质的形成。*L. plantarum* 是常见的益生菌, 属于兼性异型发酵产乳酸, 能产生植物乳杆菌素抑制致病菌以及造成发酵食品腐败的菌种(如 *Bacillus cereus*、*Clostridium sporogenes*、*Enterococcus faecalis*、*Listeria* spp.、*Staphylococcus* spp.等)生长^[14], 还能产生淀粉

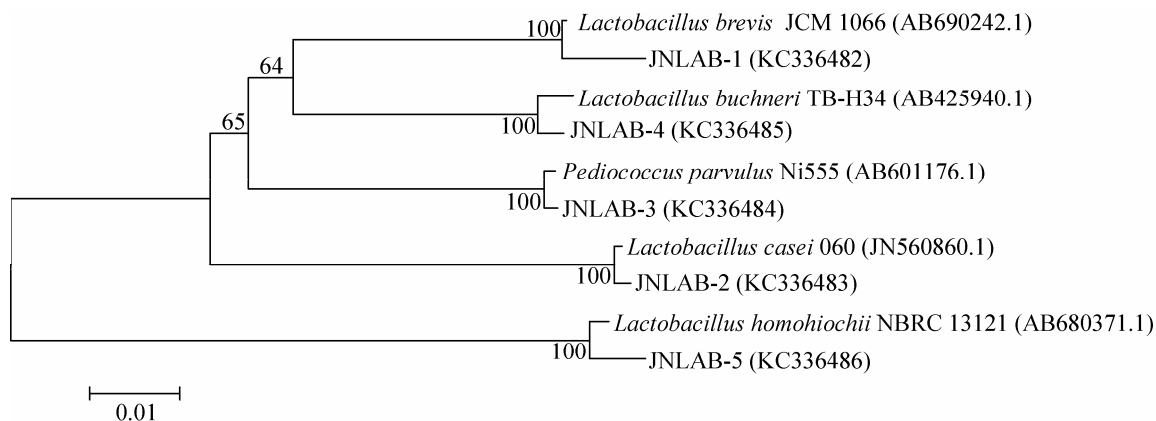


图 4 基于乳酸菌 16S rRNA 基因序列构建的系统发育树

Fig. 4 Phylogenetic tree based on LAB 16S rRNA gene sequences

Note: The phylogenetic tree was constructed by Neighbore-Joining method of MEGA with bootstrap values calaulated from 1 000 resampling. The numbers in the brackets are gene sequence accession numbers in GenBank.

酶^[15],促进淀粉分解成小分子糖类物质,提供碳源的同时保证发酵的顺利进行。

3 展望

本研究运用 PCR-DGGE 技术对酱香型、清香型白酒发酵体系中的乳酸菌群结构组成进行了检测分析,揭示了两种香型白酒发酵过程中乳酸菌菌群组成和动态消长规律的差异。采用传统微生物分离方法确定、并获得了酱香型白酒发酵过程中的优势乳酸菌菌种,为进一步分析乳酸菌在酱香型白酒、乃至中国白酒发酵体系中的功能提供了依据。

乳酸菌在中国白酒发酵体系中的作用是双重的。在白酒发酵过程中,乳酸菌数量控制得当的情况下,具有能保证发酵顺利进行、赋予白酒独特风味口感的积极正面作用,但若由于某些原因造成乳酸菌大量的繁殖或菌群组成异常,则其相应的一些代谢产物(如乳酸、细菌素等)含量会急剧升高,改变酿造环境的微生物区系,进而对产品品质造成负面的影响。

由于白酒酿造微生物来自于环境,受到白酒酿造特殊环境的长期驯化,因此微生物菌株形成了特殊的生物活性。所以,目前已经检测到的乳酸菌种是否在中国白酒发酵体系中具有在传统发酵食品中的功能及影响还是未知的,需要更深入的实验摸索、探究。

参 考 文 献

- [1] Leroy F, Vuyst LD. Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry[J]. Trends in Food Science and Technology, 2004, 15(2): 67-78.
- [2] Ravyts F, Vuyst LD. Prevalence and impact of single-strain starter cultures of lactic acid bacteria on metabolite formation in sourdough[J]. Food Microbiology, 2011, 28(6): 1129-1139.
- [3] 刘莉萌,张斌,张利平,等.浓香型白酒窖池中片球菌的分离与鉴定[J].酿酒科技,2007(2):22-28.

- [4] 孙超,刘勇.白酒生产中乳酸菌的分布及主要代谢产物[J].中国酿造,2012,31(5):1-3.
- [5] 李维青.浓香型白酒与乳酸菌、乳酸、乳酸乙酯[J].酿酒,2010,37(3):90-93.
- [6] Wang HY, Zhang XJ, Xu Y, et al. Analysis and comparison of the bacterial community in fermented grains during the fermentation for two styles of Chinese liquor[J]. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, 2008, 35(6): 603-609.
- [7] Walter J, Hertel C, Tannock GW, et al. Detection of *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc* and *Weissella* species in human feces by using group-specific PCR primers and denaturing gradient gel electrophoresis[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2001, 67(6): 2578-2585.
- [8] Wang HY, Gao YB, Xu Y, et al. Characterization and comparison of microbial community of different typical Chinese liquor Daqu by PCR-DGGE[J]. Letters in Applied Microbiology, 2011, 53(2): 134-140.
- [9] Pereira CI, Barreto Crespo MT, San Romao MV. Evidence for proteolytic activity and biogenic amines production in *Lactobacillus curvatus* and *L. homohiochii*[J]. International Journal of Food Microbiology, 2001, 68(3): 211-216.
- [10] Oude Elferink SJWH, Krooneman J, Gottschal JC, et al. Anaerobic conversion of lactic acid to acetic acid and 1,2-propanediol by *Lactobacillus buchneri*[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2001, 67(1): 125-132.
- [11] Martin MC, Fernandez M, Linares DM, et al. Sequencing, characterization and transcriptional analysis of the histidine decarboxylase operon of *Lactobacillus buchneri*[J]. Microbiology, 2005, 151(4): 1219-1228.
- [12] Naaber P, Smidt I, Stsepetova J, et al. Inhibition of *Clostridium difficile* strains by intestinal *Lactobacillus* species[J]. Journal of Medical Microbiology, 2004, 53(6): 551-554.
- [13] Martinez-Cuesta MC, Fernandez de Palencia P, Requena T, et al. Enzymatic ability of *Lactobacillus casei* subsp. *casei* IFPL731 for flavour development in cheese[J]. International Dairy Journal, 2001, 11(8): 577-585.
- [14] Reenen van CA, Dicks LMT, Chikinddas ML. Isolation, purification and partial characterization of plantaricin 423, a bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum*[J]. Journal of Applied Microbiology, 1998, 84(6): 1131-1137.
- [15] Sanni AI, Morlon-Guyot J, Guyot JP. New efficient amylase-producing strains of *Lactobacillus plantarum* and *L. fermentum* isolated from different Nigerian traditional fermented foods[J]. Journal of Applied Microbiology, 2002, 72(1): 53-62.