

## 荧光定量 PCR 方法检测白酒发酵过程中 *Aspergillus tubingensis* 生物量

陈笔 吴群 徐岩\*

(工业微生物技术教育部重点实验室 江南大学生物工程学院 酿酒科学与酶技术中心 江苏 无锡 214122)

**摘要:**【目的】为了更好地分析霉菌在白酒发酵过程中的作用,需要快速准确地测定发酵过程中霉菌生物量的变化,本实验以白酒酿造中常用的塔宾曲霉(*Aspergillus tubingensis*)为例,建立一套快速准确定量塔宾曲霉生物量的方法。【方法】优化从酒醅中提取基因组的方法,设计和验证专一性引物,建立实时荧光定量 PCR (Real-time quantitative PCR)方法,验证方法的有效性并应用于白酒发酵过程中塔宾曲霉生物量的检测。【结果】用原位机械破碎法提取酒醅中总基因组,其 DNA 的浓度能够达到  $1.060 \times 10^5$  ng/g 酒醅;同时建立了一套快速准确测定固态基质中霉菌生物量的方法,并应用于白酒生产(制曲、堆积发酵和窖池发酵过程)中塔宾曲霉生物量的定量。【结论】实时荧光定量 PCR 方法能够快速准确地测定固态基质中霉菌的生物量,且检测限较低,对今后的相关研究具有借鉴意义。

**关键词:** 荧光定量 PCR, 霉菌, 固态发酵, 塔宾曲霉, 生物量

## Detection and quantification the biomass of *Aspergillus tubingensis* in Chinese liquor fermentation process by real-time qPCR

CHEN Bi WU Qun XU Yan\*

(The Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, School of Biotechnology, Jiangnan University, Center for brewing Science and Enzyme Technology, Wuxi, Jiangsu 214122, China)

**Abstract:** [Objective] In order to better understand the role of filamentous fungi in Chinese liquor fermentation process, a rapid and accurate method to monitor the change of fungal biomass is necessary. This study established a real-time qPCR method to detect and quantify *Aspergillus tubingensis*, which is widely used in Chinese liquor fermentation. [Methods] The methods of extracting genome from fermented grains have been optimized, the specific primers for *A. tubingensis* has also been designed and validated. [Results] The total DNA extracting from fermented grains can reach  $1.060 \times 10^5$  ng/g by *in situ* mechanical crushing method. The applicability of real-time qPCR method to detect *A. tubingensis* in solid-state matrix has been validated in liquor fermentation process. [Conclusion] Real-time qPCR method can rapidly and accurately detect the

基金项目: 国家 863 计划项目(No. 2012AA021301, 2013AA102108); 国家自然科学基金项目(No. 31000806, 31371822, 31271921); 2011 协同创新计划

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

收稿日期: 2014-03-05; 接受日期: 2014-05-29; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2014-06-06

fungus biomass in solid-state matrix, which provides a powerful tool for related researches.

**Keywords:** Real-time qPCR, Filamentous fungi, SSF, *Aspergillus tubingensis*, Biomass

中国白酒的发酵过程多采用开放式固态发酵,由复杂微生物群落共同发酵而酿造出其独特的风味。发酵过程中的霉菌、酵母和细菌共同将酿造原料降解并转化为乙醇和风味物质,不同香型白酒的风格与其独特的酿造微生物群落结构紧密相关<sup>[1]</sup>。霉菌在发酵过程中分泌多种酶,降解大分子物质如淀粉、蛋白质等,为酵母和细菌的生长提供了营养基质;同时也能够分泌一些酯化酶、代谢产物等,对中国白酒的风味也有重要的影响<sup>[2]</sup>。因此研究霉菌的生长和生理变化对了解和改善中国白酒的酿造工艺有着重要的意义。

传统的开放式自然发酵有多种霉菌参与,例如曲霉属、犁头霉属、根霉属、毛霉属、青霉属和红曲霉属等<sup>[2-5]</sup>。但是开放式的发酵容易受有害微生物的影响,产品质量不容易控制,因此很多酒厂开始使用纯种霉菌制曲代替部分大曲,并取得了良好的效果<sup>[1]</sup>。其中塔宾曲霉(*Aspergillus tubingensis*)产酸多能抑制杂菌,它的酸性蛋白酶和淀粉酶活高,淀粉酶的耐酒精、耐酸能力强,生长速度快,目前被广泛应用于芝麻香型等白酒的生产<sup>[6-7]</sup>。

霉菌生物量测定的传统方法主要是平板菌落计数法,但是这种方法有他的局限性。在霉菌生长初期,菌丝大量生长而菌落数难以真实反映霉菌的生长。另外,涂布计数的方法需要约3-7 d的长时间培养。同时,中国白酒酿造是多种微生物的混合固态发酵,因此通过称菌干重、测定氨基葡萄糖等细胞成分的方法测定霉菌含量也不适用<sup>[8-9]</sup>。与传统方法相比,实时荧光定量PCR(Real-time quantitative PCR)法具有操作的简便性、专一性和灵敏度高的优势,已被广泛应用到环境、食品等领域中检测和测定细菌、酵母、丝状真菌等<sup>[10-11]</sup>。有研究报道用实时荧光定量PCR方法监测奶酪成熟过程中卡门培尔青霉(*Penicillium camemberti*)和娄地青霉(*Penicillium roqueforti*)等丝状真菌的生物

量<sup>[9-12]</sup>,以及监测棒曲霉、黄曲霉在粮食、食品中的含量<sup>[13-14]</sup>。但目前还没有使用实时荧光定量PCR方法测定中国白酒酿造过程中霉菌生物量变化的相关文献。

本研究首先对酒醅中总基因组的提取方法进行了优化,使得DNA质量和纯度满足实时荧光定量PCR反应;然后建立一种基于实时荧光定量PCR的定量方法,验证测定方法的实用性并对中国白酒生产过程中塔宾曲霉的生物量变化进行测定,为进一步研究和改善中国白酒发酵的工艺提供了强有力的工具。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌株及试剂

**1.1.1 菌种:**所使用的22株霉菌分别属于不同的种属:其中20株由本实验室从不同酒厂的生产过程分离并保藏,2株源于中国普通微生物菌种保藏管理中心(CGMCC)。所有菌株保藏于-80℃,使用前活化接种于PDA培养基<sup>[1]</sup>,于30℃培养3-7 d。

**1.1.2 发酵样品采集:**白酒发酵样品取自河南某芝麻香型酒厂,跟踪了整个白酒酿造生产过程(曲池制曲、堆积发酵和窖池发酵)。曲池制曲在0、8、16、24、32 h各取1个样品,堆积发酵过程也是每隔8 h取一次样品,窖池发酵过程在0、5、10、15、20、25、30 d各取一次。每次取样量约100 g,分成两份(每份约50 g)分别保存于4℃和-20℃。

**1.1.3 霉菌涂布计数方法:**取4℃保存的样品5 g于100 mL无菌生理盐水中,置于摇床中200 r/min培养30 min,吸取溶液并涂布于PDA培养基。30℃培养3-7 d,计算菌落数。

**1.1.4 主要仪器及试剂:**SYBR Green Supermix、实时荧光定量PCR仪,美国Bio-Rad;细胞破碎仪FastPrep H-24,美国MP-Biomedicals;Beckman离心机,美国贝克曼。DNA提取试剂盒,TIANGEN;

PCR 试剂、DNA Ladder Marker , TaKaRa 宝生物公司 ; 引物合成 , 上海生工生物工程有限公司 ; DNA 纯化试剂盒 , GeneClean turbo kit , MP Biomedicals ; 其他试剂均购自国药集团或者进口分析纯。

## 1.2 实验方法

**1.2.1 基因组 DNA 的提取:** 采用试剂盒 (TIANGEN) 提取纯培养菌株的基因组 DNA , 用于验证引物专一性。来自于发酵样品的 DNA 使用 3 种不同方法提取。(1) 异位提取法<sup>[15]</sup>: 称取 6 g 发酵样品 , 用无菌 0.1 mol/L PBS 缓冲液悬浮振荡 , 4 °C、300 r/min 离心 5 min , 收集上清 , 重复 2 次。将上清液 4 °C、12 000 r/min 离心 3 min , 收集沉淀并转移到加有 0.3 g 玻璃珠的螺帽管中 , 加入苯酚 , 使用 FastPrep H-24 破碎仪以 4 m/s 破碎 3×30 s ; 后加入 10% SDS 并用氯仿:异戊醇溶液(24:1, 体积比)、氯仿、苯酚各抽提 1 次 , 最后用冰乙醇沉淀。(2) 原位机械破碎: 称取 0.20 g 样品于螺帽管 , 用 ddH<sub>2</sub>O 冲洗 3 次 , 然后加入 0.3 g 玻璃珠 , 再加入氯仿 , 后面操作步骤同方法(1)。(3) 液氮研磨+溶壁酶+SDS<sup>[16]</sup>: 称取 2 g 酒醅于研钵 , 加入液氮直接研磨并转移至离心管 , 然后在 DNA 提取液中加入溶菌酶 , 摇床上 37 °C 摇动 30 min , 向离心管中加入 15 mL 10% SDS , 离心 10 min。收集上清并用氯仿:异戊醇和 0.6 倍体积的异丙醇各抽提一次 , 最后用冰乙醇洗涤沉淀。

所提取的总 DNA 都将过柱纯化 , 并用 Nano Drop 8800 测定基因组的浓度以及  $A_{260}/A_{280}$  的比值 , 置于 -20 °C 保存备用。

**1.2.2 专一性引物设计:** 丝状真菌的 ITS 区域种内相对保守 , 种间进化差异较大 , 因此选取这一区域设计针对 *Aspergillus tubingensis* 的专一性引物。不同霉菌的 ITS 区域序列可以从 NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) 获得 , 将获得的序列与本实验菌株的序列进行多序列比对 (DNAMAN) , 初步设计出专一性的引物。利用 NCBI 提供的 Primer-Blast 功能虚拟验证引物的专一性 , 挑选出最佳的引物并进一步通过实验验证。

**1.2.3 引物专一性验证:** 实时荧光定量 PCR 反应体系为 20 μL : 10 μL SYBR Green Supermix , 引物各 400 nmol/L , 模板 100 ng , 补充 ddH<sub>2</sub>O 至 20 μL。优化最终的反应条件为 : 98 °C 2 min ; 98 °C 5 s , 58 °C 5 s , 共 40 个循环 , 每次反应结束后 , 读板温度从 70 °C 梯度升温至 90 °C , 每隔 0.5 °C 读板一次 , 绘制溶解曲线。所有样品都有 2 个平行样 , 通过溶解曲线确定引物专一性。

**1.2.4 标准曲线的建立:** 用血球计数板计数塔宾曲霉孢子悬浮液的浓度 , 将霉菌孢子悬浮液稀释到  $6.8 \times 10^5$  spores/mL , 提取孢子中的基因组。以 10 倍稀释塔宾曲霉的基因组作为模板 , 利用优化的定量 PCR 反应条件扩增稀释的模板 , 将得到的  $C_t$  值与孢子数目的对数值绘制标准曲线。每个样品取两个平行样。扩增效率通过公式  $E=10^{(-1/b)}-1$  来计算 , 其中  $b$  是标准曲线的斜率。通过相关性系数和扩增效率来衡量标准曲线的可靠性。

**1.2.5 实时荧光定量 PCR 方法的适用性验证:** 将不同数量的 *A. tubingensis* 孢子注入模拟麸曲中 , 应用荧光定量 PCR 方法定量 *A. tubingensis* 的数量 , 对方法的适用性进行验证。回收率 (Recovery) 被定义为涂布平板计数结果和实时荧光定量 PCR 计数结果两种测量方法的一致程度 , 计算公式<sup>[11]</sup> :

$$R_1 = \frac{\log_{10} M_1}{\log_{10} M_0} \times 100\%$$

$R_1$  : 荧光定量 PCR 方法回收率 ;  $M_1$  : 荧光定量 PCR 方法检测到 *A. tubingensis* 孢子数量 ;  $M_0$  : 模拟大曲中添加的 *A. tubingensis* 孢子数量 (涂布平板计数)。

**1.2.6 实时荧光定量 PCR 方法的生产应用:** 将实时荧光定量 PCR 方法应用于实际生产中 , 采集河南某芝麻香型白酒厂的发酵样品 , 测定生产过程中塔宾曲霉的生物量变化 , 并将定量测定结果与稀释涂布计数结果相比较。

## 2 结果与分析

### 2.1 基因组 DNA 的提取

白酒发酵的固态酒醅中含有高粱、稻壳、麸皮

等原料,在发酵过程中产生了大量有机酸、多糖、以及醇类、酚类等物质<sup>[16]</sup>。由于霉菌的菌丝难以与固态基质分离,且多糖、多酚会影响后续 PCR 扩增反应,有效提取固态基质中的 DNA 并减少多糖、多酚等杂质的影响是实时荧光定量 PCR 法检测的重要前提。

首先比较了原位提取、异位提取和酶法提取 3 种总基因组提取方式。结果如表 1 所示,3 种提取基因组的方法中方法(2)提取效率最高,每克酒醅提取的 DNA 浓度可以达到  $1.060 \times 10^5$  ng/g 样品;方法(1)提取效率最低,每克酒醅只能提取到的 DNA 浓度为  $5.992 \times 10^2$  ng/g。不同方法提取基因组效果不同,可能是菌丝难以与基质分离,异位提取失去了一部分生物量而降低了提取效率,以及不同的破碎方法对细胞内 DNA 的释放效果不一样。所提取的基因组经过柱纯化之后,基因组的  $A_{260}/A_{280}$  值介于

1.8–2.0 之间,进一步用 ITS rDNA 区域引物 ITS1/ITS4 扩增提取的基因组,结果显示 DNA 模板满足 PCR 要求。由于方法(2)最大限度地提取了酒醅中微生物的基因组,较好地满足了本实验的要求,因此后面的研究采用方法(2)作为提取发酵样品中基因组的方法。

## 2.2 引物设计及专一性验证

针对塔宾曲霉(*A. tubingensis*)的 ITS 区域共设计了 5 对特异性引物(表 2),这 5 对引物针对 ITS 区域的不同部分,扩增产物大于 78 bp 小于 250 bp,符合实时荧光定量 PCR 方法的基本要求。为了提高实验效率并减少实验材料消耗,先通过 NCBI 中提供的 Primer-Blast 功能进行计算机虚拟验证,排除专一性较差的 4 对引物,其中 Primer pair 3 被选出进一步实验验证。

表 1 不同基因组 DNA 提取方法的结果比较

Table 1 The results of three different DNA extracting methods

DNA 提取方法 DNA extraction method	基因组浓度 DNA concentration (mg/L)	纯化之后提取效率 Amplification efficacy (ng/g)	$A_{260}/A_{280}$	ITS 引物 PCR ITS primer PCR
(1) 异位提取法 Separating extraction method	313.6	$5.992 \times 10^2$	1.92	+
(2) 原位机械破碎 <i>In situ</i> mechanical crushing method	981.9	$1.060 \times 10^5$	1.80	+
(3) 液氮+溶壁酶+SDS Liquid nitrogen+lywallzyme+SDS	406.6	$3.853 \times 10^3$	1.85	+

注:+:该基因组模板能够被引物扩增。

Note:+: Positive PCR result.

表 2 本实验用于评估 qPCR 引物专一性的菌株

Table 2 The designed specific primers for *A. tubingensis*

引物编号 No. of primers	上游引物序列 Upstream primer sequences (5'→3')	下游引物序列 Downstream primer sequences (5'→3')	扩增子 Ampicon (bp)
Primer pair 1	CGGCCAATCCTACAGAGCAT	ACGCAGCGAAATGCGATAAC	248
Primer pair 2	AATGGTTGGAAAACGTCGGC	GTCCGATCCTCGAGCGTATG	78
Primer pair 3	GCCGGAGACCCCAACAC	TGTTGAAAGTTTAACTGATTGCATT	79
Primer pair 4	CCTGGGTGTGTACCTGATCC	ATGGGGCTTTGTCACATGCT	97
Primer pair 5	GGTGTGTACCTGATCCGAGG	GAGCGTATGGGGCTTTGTCA	99

以白酒生产过程中常见的 22 种微生物的基因组为模板,使用 Primer pair 3 这对引物进行实时荧光定量 PCR 扩增反应,其反应结果如表 3 所示。可以看到,这对引物能够扩增 3 株不同来源的 *A. tubingensis*,不能扩白酒生产中常见的其他霉菌、酵母以及细菌。对 *A. tubingensis* 的扩增产物为 79 bp,溶解温度为 78.5 °C,扩增曲线正常且只有单一的溶解峰(未显示)。因此,这对引物有着较好的专一性,能够满足本实验要求。

### 2.3 标准曲线的建立

通过优化荧光定量 PCR 反应程序和反应体

系,塔宾曲霉的最佳退火温度是 58.3°C。以 10 倍稀释的 DNA 为模板建立标准曲线,荧光定量 PCR 扩增反应正常(图 1)。然后以孢子浓度和实时荧光定量 PCR 反应所得到的  $C_t$  值做标准曲线(图 2),其结果具有良好的线性相关, $R^2$  大于 0.996;标准曲线的斜率为-3.291,算出荧光定量 PCR 的扩增效率为 101.2%,满足实时荧光定量 PCR 定量的基本要求。标准曲线的检测范围是  $7.41 \times 10^0 - 7.41 \times 10^5$  spores/mL,最低检测限 < 1.27 spores/mL,能够满足实验和生产的检测要求。

表 3 塔宾曲霉专一性引物 PCR 验证

Table 3 The specificity of the *A. tubingensis*-specific (ITS) validation by real-time qPCR systems

菌株种属名 Species	编号 Strain name	扩增引物 AtFor/AtRev Primer amplification
<i>Aspergillus tubingensis</i>	XJ31-1	+
<i>Aspergillus tubingensis</i>	QK2	+
<i>Aspergillus tubingensis</i>	YS-1	+
<i>Aspergillus oryzae</i>	XJ10	-
<i>Aspergillus oryzae</i>	3.05232	-
<i>Aspergillus fumigatus</i>	XJ29	-
<i>Aspergillus flavus</i>	XJ31	-
<i>Aspergillus niger</i>	QK3	-
<i>Aspergillus terreus</i>	XJ28	-
<i>Aspergillus parasiticus</i>	QK5	-
<i>Paecilomyces variotii</i>	XJ1-1	-
<i>Paecilomyces variotii</i>	XJ1-2	-
<i>Penicillium corylophilum</i>	XJ30	-
<i>Penicillium chrysogenum</i>	XJ2	-
<i>Penicillium namyslowskii</i>	XJ8	-
<i>Penicillium polonicum</i>	XJ9	-
<i>Talaromyces spectabilis</i>	XJ5	-
<i>Monascus ruber</i>	XJ21	-
<i>Mucor rouxianus</i>	QK3	-
<i>Rhizopus oryzae</i>	3.05842	-
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	MTY1	-
<i>Issatchenkia orientalis</i>	MTY2	-
<i>Pichia anomala</i>	MTY3-1	-
<i>Bacillus licheniformis</i>	MTB1	-
<i>Bacillus subtilis</i>	MTB2	-

注: +: 引物能够扩增该菌株( $0 < C_t \leq 32.0$ ); -: 不能扩增该菌株( $C_t = 0$  or  $> 36.0$ ).

Note: +: Positive qPCR result ( $0 < C_t \leq 32.0$ ); -: Negative qPCR result ( $C_t = 0$  or  $> 36.0$ ).

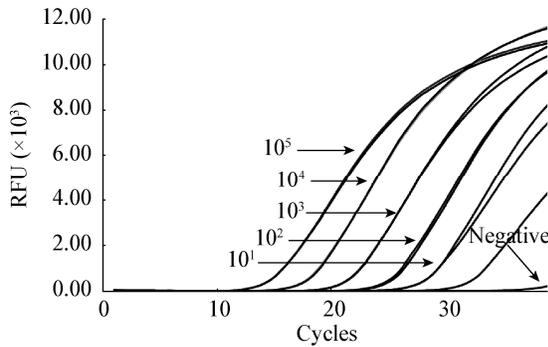


图1 塔宾曲霉基因组梯度稀释的扩增曲线  
Figure 1 Amplification plot of standard curves obtained from decimal dilutions of conidial suspensions

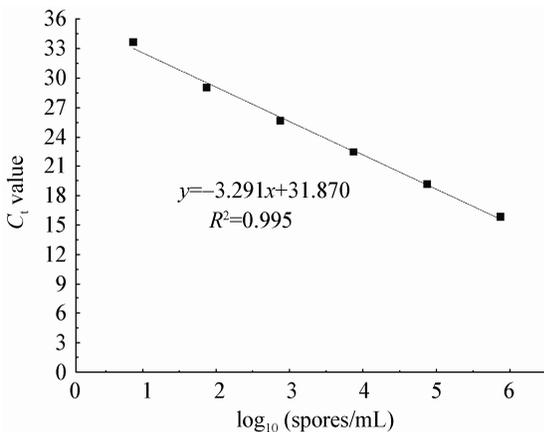


图2 塔宾曲霉实时荧光定量 PCR 法定量的标准曲线  
Figure 2 Standard curve of *A. tubingensis* generated from the amplification data  
Note:  $C_1$  values are plotted against the spores concentration as spores/mL per action.

## 2.4 荧光定量 PCR 方法的适用性验证

模拟酒曲被用来验证分析实时荧光定量 PCR 方法的适用性,即直接测定白酒生产过程中酒曲和酒醅里霉菌的生物量。首先将收集的塔宾曲霉孢子悬浮液进行不同浓度稀释,使用血球计数板计数;同时添加不同数量的塔宾曲霉孢子到固态模拟酒曲中,提取其基因组,采用实时荧光定量 PCR 方法测定塔宾曲霉的孢子数量。如表 4 所示,血球计数板计数的数值和荧光定量 PCR 方法测定的数值在同一个数量级,回收率在 83.51%–93.12%之间,因此实时荧光定量 PCR 方法具有较高的生产适用性。

## 2.5 实时荧光定量 PCR 方法的生产应用

用涂布平板计数和实时荧光定量 PCR 法分别对河南某芝麻香型酒厂的制曲过程、堆积发酵以及窖池发酵 3 个阶段中的塔宾曲霉生物量的变化进行了分析。如表 5 所示,在制曲开始后的 8 h,平板计数显示塔宾曲霉生物量没有明显变化,而荧光定量 PCR 检测的结果却增加了 34.8%,没有延迟增长的过程。堆积开始后,塔宾曲霉继续增殖并在 16 h 时达到最大值,随后生物量开始下降直至发酵结束。这是由于窖池发酵是一个厌氧过程,随着发酵的进行,氧气减少,酒醅中乙醇和酸增加,塔宾曲霉由于环境的不适应性而逐渐丧失生物活性。

表 4 实时荧光定量 PCR 法在模拟酒曲中的适用性分析  
Table 4 The applicability analysis of real-time qPCR in *Koji*

添加的孢子数量 Spores addition (spores/g)	基因组浓度 DNA concentration (mg/L)	$A_{260}/A_{280}$	荧光定量数值 $C_1$ value (spores/g)	回收率 Recovery (%)
$5.72 \times 10^7$	2 057	1.95	$5.27 \times 10^7$	92.13
$5.72 \times 10^6$	1 823	1.97	$4.88 \times 10^6$	85.31
$5.72 \times 10^5$	1 759	2.03	$4.78 \times 10^5$	83.51
$5.72 \times 10^4$	1 672	1.89	$4.99 \times 10^4$	87.25
$5.72 \times 10^3$	1 584	2.05	$5.17 \times 10^3$	90.47

表 5 涂布平板计数和实时荧光定量 PCR 法对白酒生产过程中塔宾曲霉生物量的分析比较  
Table 5 The results comparison of two quantification methods for analysis the biomass of *A. tubingensis* in Chinese liquor making process

样品 Sample		涂布平板计数 Plate counts (CFU/g)	实时荧光定量 PCR Real-time qPCR (spores/g)
制曲过程 <i>Koji</i> making process	0 h	$(2.84 \pm 0.24) \times 10^6$	$(2.90 \pm 0.18) \times 10^6$
	8 h	$(2.87 \pm 0.21) \times 10^6$	$(3.91 \pm 0.32) \times 10^6$
	16 h	$(3.20 \pm 0.34) \times 10^6$	$(5.35 \pm 0.57) \times 10^6$
	24 h	$(8.43 \pm 0.87) \times 10^6$	$(9.85 \pm 0.73) \times 10^6$
	32 h	$(9.58 \pm 1.22) \times 10^6$	$(1.02 \pm 0.18) \times 10^7$
堆积发酵 Stacking fermentation	0 h	$(0.93 \pm 0.14) \times 10^3$	$(3.85 \pm 0.45) \times 10^3$
	8 h	$(1.2 \pm 0.12) \times 10^3$	$(4.78 \pm 0.53) \times 10^3$
	16 h	$(4.3 \pm 0.37) \times 10^3$	$(6.25 \pm 0.67) \times 10^3$
	24 h	$(3.4 \pm 0.29) \times 10^3$	$(5.62 \pm 0.51) \times 10^3$
	29 h	$(1.7 \pm 0.14) \times 10^3$	$(4.50 \pm 0.38) \times 10^3$
窖池发酵 Alcohol fermentation	0 d	$(1.1 \pm 0.12) \times 10^3$	$(3.85 \pm 0.17) \times 10^3$
	5 d	$(1.4 \pm 0.16) \times 10^3$	$(4.12 \pm 0.23) \times 10^3$
	10 d	—	$(1.34 \pm 0.14) \times 10^3$
	15 d	—	$(9.6 \pm 0.52) \times 10^2$
	20 d	—	$(2.43 \pm 0.23) \times 10^1$
	25 d	—	—
	30 d	—	—

注: —: 未检测到塔宾曲霉; 表中实验结果都是 3 个平行样品的平均值。

Note: —: Negative PCR result,  $n=3$ .

在白酒生产的堆积和发酵过程中,可以看出涂布计数的结果均小于荧光定量 PCR 检测结果,且有一个生物量增长延迟的过程,这种差异可能是由于两种测量方法原理上的不同。荧光定量 PCR 方法是根据细胞核中的 DNA 特定区域的拷贝数表征生物量,而可培养方法是根据平板上形成的菌落数表征生物量。平板计数得到的一个菌落可能是由一个孢子构成,也可能是一段菌丝体,因此在制曲开始之后,孢子在合适的条件下开始萌发,开始进行有丝分裂,形成短小的菌丝,荧光定量 PCR 能够

有效的反应塔宾曲霉的这个生长过程,而平板计数不能。

同时,涂布平板方法在窖池发酵 10 d 时已经不能检测到塔宾曲霉。发酵后期由于衰亡霉菌中的 DNA 不断降解,同时醇类、醛类、酮类、酚类等物质的积累也使得从固态酒醅基质中更难以提取到足够浓度的 DNA,荧光定量 PCR 方法在发酵 25 d 时也不能检测到塔宾曲霉的基因组。尽管如此,荧光定量 PCR 方法的检测限仍然低于涂布平板计数的方法。

### 3 结论

在中国白酒酿造过程中,霉菌提供了丰富酶类而成为必不可少的酿造微生物,而生物量是表征霉菌生物活性的一个重要指标,因此发酵白酒发酵过程需要快速准确监测霉菌生物量的变化。实时荧光定量 PCR 方法近些年虽然在医药、食品等研究中得到了广泛的应用,但用于检测白酒酿造过程中的霉菌生物量还少见报道。本文针对常见白酒生产中常用的塔宾曲霉建立了一套实时荧光定量 PCR 定量方法:从基因组提取,设计引物,引物专一性验证,标准曲线的建立、方法准确性的验证,再到生产实践的具体应用。该方法具有快速准确,检测限较低的特点,对中国白酒酿造的进一步研究具有一定的借鉴意义。

### 参 考 文 献

- [1] 沈怡方. 白酒生产技术全书[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 1998: 213-255.
- [2] Zheng XW, Tabrizi MR, Nout MJR, et al. Daqu-a traditional Chinese liquor fermentation starter[J]. Journal of the Institute of Brewing, 2011, 117(1): 82-90.
- [3] Liu X, Guo KL, Zhang HX. Determination of microbial diversity in Daqu, a fermentation starter culture of Maotai liquor, using nested PCR-denaturing gradient gel electrophoresis[J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2012, 28(6): 2375-2381.
- [4] Shi JH, Xiao YP, Li XR, et al. Analyses of microbial consortia in the starter of Fen Liquor[J]. Letters in Applied Microbiology, 2009, 48(4): 478-485.
- [5] 庄名扬. 红曲霉在中国白酒生产中的作用[J]. 酿酒科技, 2005, 32(5): 101-102.
- [6] 周恒刚, 鸣吴. 话说河内白曲[J]. 酿酒, 1993(2): 9-14.
- [7] 刘建波, 曹建全. 河内白曲培养时间及孢子快速检验方法研究[J]. 中国酿造, 2010(12): 56-58.
- [8] 魏培莲, 岑沛霖, 盛春琦. 3种固态发酵生物量测定方法的比较[J]. 食品与生物技术学报, 2006, 25(1): 60-69.
- [9] Le Dréan G, Mounier J, Vasseur V, et al. Quantification of *Penicillium camemberti* and *P. roqueforti* mycelium by real-time PCR to assess their growth dynamics during ripening cheese[J]. International Journal of Food Microbiology, 2010, 138(1/2): 100-107.
- [10] Zott K, Claisse O, Lucas P, et al. Characterization of the yeast ecosystem in grape must and wine using real-time PCR[J]. Food Microbiology, 2010, 27(5): 559-567.
- [11] Achilleos C, Berthier F. Quantitative PCR for the specific quantification of *Lactococcus lactis* and *Lactobacillus paracasei* and its interest for *Lactococcus lactis* in cheese samples[J]. Food Microbiology, 2013, 36(2): 286-295.
- [12] Lessard MH, Belanger G, St-Gelais D, et al. The composition of Camembert cheese-ripening cultures modulates both mycelial growth and appearance[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2012, 78(6): 1813-1819.
- [13] Mideros SX, Windham GL, Williams WP, et al. *Aspergillus flavus* biomass in maize estimated by quantitative real-time polymerase chain reaction is strongly correlated with aflatoxin concentration[J]. Plant Disease, 2009, 93(11): 1163-1170.
- [14] Sardiñas N, Vázquez C, Gil-Serna J, et al. Specific detection and quantification of *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus* in wheat flour by SYBR<sup>®</sup> Green quantitative PCR[J]. International Journal of Food Microbiology, 2011, 145(1): 121-125.
- [15] Wang HY, Gao YB, Fan QW, et al. Characterization and comparison of microbial community of different typical Chinese liquor Daqus by PCR-DGGE[J]. Letters in Applied Microbiology, 2011, 53(2): 134-140.
- [16] 倪峥飞, 许伟, 奚文芳, 等. 镇江香醋固态发酵醋醅中微生物总 DNA 提取方法比较[J]. 微生物学报, 2010, 50(1): 119-125.