

用 DGGE 方法初步解析浓香型大曲微生物群落结构

李家民¹,王海英²,张文学^{2,3},李文芳²,邹永芳¹

(1.四川沱牌舍得酒业,四川 射洪 629209;2.四川大学轻纺与食品学院,四川 成都 610065;

3.四川大学锦江学院白酒学院,四川 眉山 620860)

摘要: 以沱牌酒厂地面曲和架子曲为研究对象,将地面曲和架子曲的曲皮和曲心微生物总 DNA 进行了细菌 V3 区、古菌 V7~V8 区和真菌 18S rDNA 片段扩增后,利用 DGGE 及 Quantity One 软件分析,同时对大曲真菌 DGGE 图谱中主要优势条带进行克隆测序。结果表明,曲内微生物群落结构主要因大曲的不同部位而有所差异,制曲方式占次要地位。从 2 种曲中均检测出了嗜热真菌丝衣霉状篮状菌(*Talaromyces byssochlamydoidea*)及入窖粮糟中也存在孢圆酵母(*Torulaspota*)。

关键词: 大曲; 细菌; 古菌; 真菌; DGGE

中图分类号:TS261.1;Q93-3;TQ925.7;TS262.3 文献标识码:A 文章编号:1001-9286(2012)11-0032-04

Preliminary Analysis of Microbial Communities Structure in Luzhou-flavor Daqu by DGGE

LI Jiamin¹, WANG Haiying², ZHANG Wenxue^{2,3}, LI Wenfang² and ZOU Yongfang¹

(1.Sichuan Tuopai Shede Liquor Industry Co.Ltd, Shehong, Sichuan 629209;2.College of Light Industry,Textile and Food Engineering, Sichuan University,Chengdu,Sichuan 610065;3.School of Liquor-making Engineering,Jinjiang College of Sichuan University,Meishan,Sichuan 620860, China)

Abstract: Shelf Daqu and ground Daqu were studied. By directly extracting DNA of shelf Daqu and ground Daqu, then amplifying 16S rDNA of V7-V8 region of archaea and 16S rDNA of V3-V4 region of bacteria and 18S rDNA of fungus by PCR, denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and software Quantity One were applied for the analysis. Meanwhile, the cloning and sequencing of the dominant bands in DGGE fingerprints was carried out. It was found that the microbial community structure in Daqu was mainly influenced by the part of Daqu and Daqu-making patterns had less effects on microbial community structure. *Talaromyces byssochlamydoidea* and *Torulaspota* were found in both two kinds of Daqu, and *Torulaspota* also was also detected in pit entry fermented grains.

Key words: Daqu; bacteria; archaea; fungus; DGGE

白酒生产是以窖池和酒醅为基础,由环境微生物、大曲微生物和窖泥微生物而形成的复杂物质能量代谢过程^[1]。白酒的酿造离不开大曲,作为多酶多菌的微生物集合体,大曲中微生物种类丰富,通过纯培养得到的有霉菌、细菌、酵母菌和放线菌等^[2-3]。但环境中可培养的微生物种类很少,因而传统培养具有很大的局限性。PCR-DGGE 是一种检测大小相同但序列不同的 DNA 序列的方法,根据不同 Tm 值来分离不同的基因序列,能快速提供环境中有关群落组成消长情况的生物学信息^[2]。张文学课题组率先将 DGGE 等免培养技术应用到白酒酿造行业中,以分析浓香型白酒酿酒微生物群落结构及其

变化规律^[4-6]。

大曲的生产难点主要在于对曲块的培育过程,受很多因素影响,容易导致曲块质量不稳定^[7]。本实验以沱牌酒厂地面曲和架子曲为研究对象,采用 DGGE 技术对地面曲和架子曲的曲皮和曲心进行细菌、古菌和真菌的微生物群落结构分析,并利用 Quantity One 软件对 DGGE 图谱进行聚类分析,同时对大曲真菌 DGGE 图谱中主要优势条带进行克隆测序,鉴定大曲中的优势真菌类群。期望能分析不同生产方式大曲中微生物群落结构的变化规律,同时了解大曲曲皮和曲心的微生物群落结构特征,为大曲的生产制作及使用提供一定的理论依据。

基金项目:四川省科技支撑计划项目(项目编号:2008SZ0112)。

收稿日期:2012-06-05

作者简介:李家民(1964-),男,教授级高工,享受国家特殊津贴的生态酿酒专家,中国当代发明家,中国酿酒大师,四川省学术技术带头人,发表论文近 30 篇,著作 5 部,负责及参与主研了 100 余项国家级、省部(市)级等重点项目,获得国家级、省部(市)级科技奖励 40 余项,获发明专利 35 项。

优先数字出版时间:2012-08-14;地址:<http://www.cnki.net/kcms/detail/52.1051.TS.20120814.1437.002.html>。

1 材料与方法

1.1 材料

样品采集:沱牌大曲取样时间为 2011 年 11 月 25 日,样品 1 为架子曲,样品 2 为地面曲。样品在无菌样品袋中混匀后冷冻密封保存,尽快提取总 DNA 进行实验。

1.2 实验方法

1.2.1 总 DNA 提取及 PCR 扩增

采用反复冻融裂解细胞法及试剂盒相结合的方法对窖泥样品进行总 DNA 提取,详细方法参考前述报道^[9]。细菌 16S rDNA V3 区 PCR 扩增引物及程序参考已有报道^[9],扩增目的片段大小为 200 bp;古菌 16S rDNA V3~V4 区 PCR 扩增引物及扩增程序参考已有报道^[10],扩增目的片段大小为 400 bp;真菌 18S rDNA PCR 扩增引物及程序参考已有报道^[11],扩增目的片段大小为 400 bp。PCR 扩增体系组成:2×Taq PCR MasterMix 25 μ L;上、下游引物(10 μ mol/L)各 2 μ L;DNA 模板 4 μ L;ddH₂O 补足 50 μ L。

1.2.2 PCR 扩增产物变性梯度凝胶电泳及图像分析

细菌、古菌和真菌的 PCR 扩增产物通过 DGGE 分析研究微生物群落的构成。丙烯酰胺凝胶浓度为 8%,PCR 产物上样量为 50 μ L,细菌和古菌的变性梯度范围为 30%~55%(100%变性剂为 7 mol/L 尿素和 40%去离子甲酰胺),真菌的变性梯度范围为 20%~40%。在 200 V、60 $^{\circ}$ C 条件下电泳 240 min。电泳完毕用 SYBR green I(1×TAE,1:10000)染色 45 min(每隔 15 min 染 1 次,共染 3 次),通过紫外凝胶成像仪捕获图像。利用分析软件(Quantity One4.2.3,Bio-Rad)读取图谱上条带的光密度值,完成 match 比对后,采用 UPGAMA 算法进行聚类分析,并生成 DGGE 图谱相似性分析图^[9]。

1.2.3 真菌 18S rDNA DGGE 图谱主要条带比对

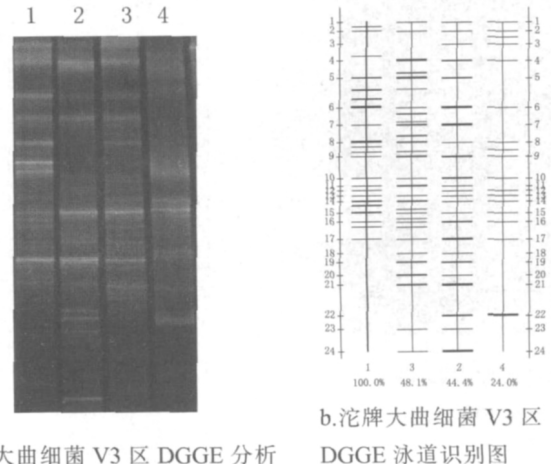
真菌 18S rDNA DGGE 电泳后,对其主要优势条带进行切胶回收。二次 PCR 后进行纯化,参考 pUCm-T vector 说明书进行转化、克隆。挑取阳性克隆子交由北京诺赛进行序列测定。得到的序列通过 GenBank 进行比较,寻找与目的序列同源性最高的菌种 16S rDNA 序列,目的序列向日本 DDBJ 数据库进行提交。

2 结果与讨论

2.1 大曲细菌 V3 区的 DGGE 分析

根据大曲细菌 DGGE 分析结果(图 1)可知,泳道 1(架子曲曲心)、泳道 2(架子曲曲皮)、泳道 3(地面曲曲皮)和泳道 4(地面曲曲心)4 个泳道可识别条带分别为 22 条、24 条、30 条、17 条。由此可见,同种发酵方式曲皮的细菌种类比曲心丰富,尤其是地面曲的曲皮是最为

丰富的,分析其原因可能是由于曲皮与空气或地面接触,因而其细菌种类受环境影响较大。



a.沱牌大曲细菌 V3 区 DGGE 分析

b.沱牌大曲细菌 V3 区 DGGE 泳道识别图

c.大曲样品相似性分析图

注:1.架子曲曲心;2.架子曲曲皮;3.地面曲曲皮;4.地面曲曲心

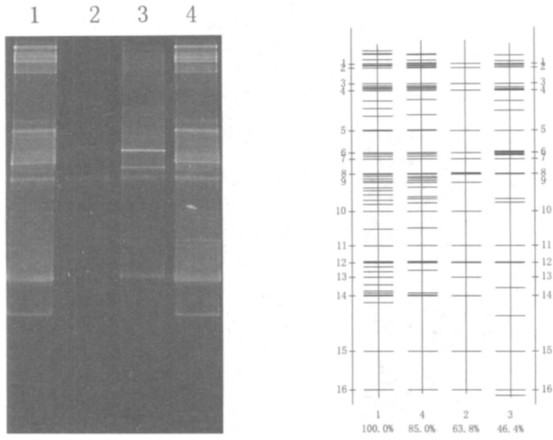
图 1 大曲细菌 V3 区的 DGGE 分析

本次实验对大曲细菌进行样品相似性分析,将 4 个样品归为一类,其相似值为 0.34,一般认为,相似值高于 0.6 的群体具有较好的相似性^[12],说明不同发酵方式大曲细菌群落结构差异较大。架子曲曲皮和地面曲曲皮的细菌群落结构相似值为 0.62,可认为二者较为相似,这也可能跟曲皮长期与空气接触有关。对于大曲细菌来说,相同条件下发酵方式对其群落结构的影响小于所在大曲部位带来的影响。

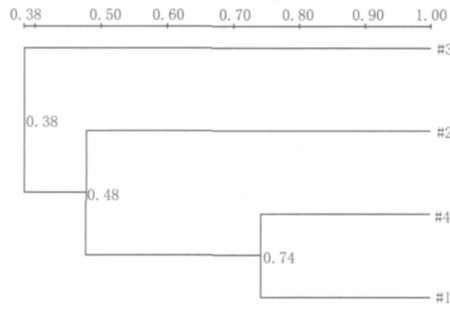
2.2 大曲古菌 V7~V8 区的 DGGE 分析

根据大曲古菌 DGGE 分析结果(图 2)可知,泳道 1(架子曲曲心)、泳道 2(架子曲曲皮)、泳道 3(地面曲曲皮)和泳道 4(地面曲曲心)4 个泳道可识别条带分别为 33 条、16 条、22 条、28 条。由此可见,同种发酵方式的曲心的古菌种类比曲皮丰富很多,分析其原因可能是由于古菌多为厌氧型,因而曲心环境更适合古菌的繁殖生长。

本次实验对大曲古菌进行样品相似性分析,将 4 个样品归为一类,其相似值为 0.38,一般认为,相似值高于 0.6 的群体具有较好的相似性,说明不同的发酵方式下大曲的古菌群落结构具有一定的差异性。架子曲曲心和地



a.沱牌大曲古菌 V3~V4 区 DGGE 图 b.沱牌大曲古菌 DGGE 泳道识别图



c.大曲样品相似性分析图

注:1.架子曲曲心;2.架子曲曲皮;3.地面曲曲皮;4.地面曲曲心

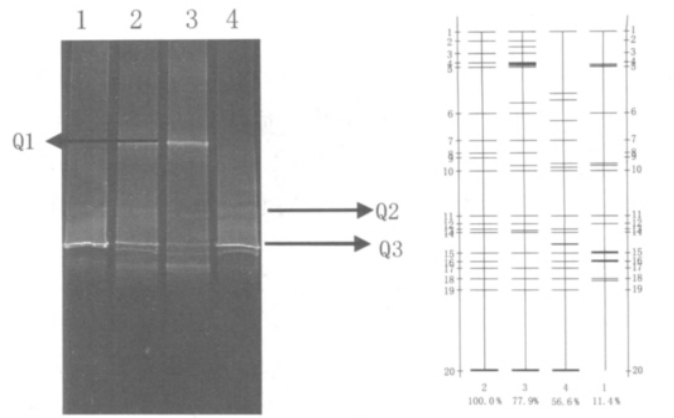
图2 大曲古菌 V7~V8 区的 DGGE 分析

面曲曲心的古菌群落结构相似值为 0.72, 可认为二者较相似,这可能是古菌在曲心部位更适宜生长。对于大曲古菌来说,相同条件下发酵方式对其微生物群落结构影响小于所在大曲部位带来的影响。

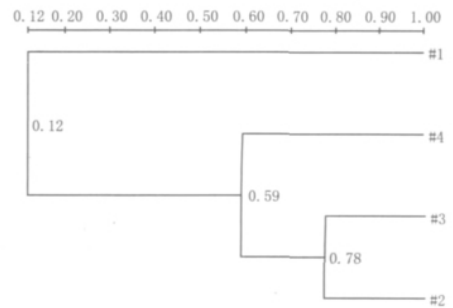
2.3 大曲真菌 18S rDNA 的 DGGE 分析

根据大曲细菌 DGGE 分析结果(图 3)可知,泳道 1(架子曲曲心)、泳道 2(架子曲曲皮)、泳道 3(地面曲曲皮)和泳道 4(地面曲曲心)4 个泳道可识别条带分别为 11 条、20 条、21 条、18 条。由此可见,同种发酵方式下曲皮的真菌种类比曲心丰富,尤其是地面曲曲皮最为丰富,分析其原因可能是由于曲皮与空气或地面接触,因而其真菌种类受环境影响较曲心大。

本次实验对大曲真菌进行样品相似性分析,将 4 个样品归为一类,其相似值为 0.12,一般认为,相似值高于 0.6 的群体具有较好的相似性,说明不同发酵方式下大曲真菌群落结构具有一定的差异性。架子曲曲皮和地面曲曲皮的真菌群落结构相似值为 0.78,可认为二者相似度较大,这可能是由于曲皮长期跟空气接触的原因。对于大曲真菌来说,相同条件下发酵方式对其微生物群落



a.沱牌大曲真菌 DGGE 图 b.大曲真菌样品泳道识别图



c.大曲真菌样品相似性分析图

注:1.架子曲曲心;2.架子曲曲皮;3.地面曲曲皮;4.地面曲曲心

图3 大曲真菌 18S rDNA 的 DGGE 分析

结构影响小于所在大曲位置。真菌 DGGE 优势条带测序结果见表 1。

表 1 大曲真菌 DGGE 主要条带分子鉴定结果

菌种编号	相似菌株	相似菌株 登录号	最大相似度 (%)
Q1	<i>Rhizopus</i> sp. SAUFS3-1	JN176204.1	99
Q2	<i>Torulaspota</i> sp. SG5S08	FJ153122.1	99
Q3	<i>Talaromyces yssochlamydoides</i>	AY526476.2	99

Q2 所对应的有孢圆酵母(*Torulaspota*) 在入窖粮糟中也有检测到,表明入窖粮糟中微生物群落结构跟大曲有一定关系。而丝衣霉状篮状菌(*Talaromyces byssochlamydoides*)为嗜热真菌,赵春青^[13]等的研究结果表明,这种真菌可促进有机物的降解,在发酵工业中,可用于生产多种酶制剂,而董瑞丽^[14]等也利用全序列克隆的方式在浓香型大曲中检测出了该菌,其有可能是大曲的重要功能菌。

3 结论

根据对细菌、真菌和古菌的 DGGE 分析结果可知,大曲微生物群落结构主要受大曲所在位置的影响,发酵方式占次要地位。对于细菌和真菌,2 种方式下的曲皮微生物种类菌比曲心丰富,且 2 种方式曲皮的细菌和真菌

均具有较好的相似性;而曲心的古菌种类则比曲皮丰富,且2种发酵方式的曲心古菌具有较好的相似性,这可能是受环境影响,这对指导大曲的生产和使用具有一定意义。此次实验在浓香型大曲中检测出了嗜热真菌丝衣霉状篮状菌(*Talaromyces byssochlamydoidea*)的存在,同时检测出了入窖粮糟中存在有孢圆酵母(*Torulasporea*),表明PCR-DGGE方法在大曲微生物群落结构的分析、寻找大曲特征微生物种群以及探讨其在酒醅发酵过程中的演变规律等方面的研究中具有可行性。

参考文献:

- [1] 罗惠波,侯海波,黄治国,等.大曲真核微生物群落结构 PCR-DGGE 电泳条件优化[J].四川理工学院学报(自然科学版),2011,24(5):515-518.
- [2] 潘勤春,孟镇,钟其顶,等.分子生态学技术在大曲微生物群落研究中的应用前景初探[J].酿酒科技,2011(3):87-91.
- [3] 李云英,李能树.大曲微生物区系的初步研究[J].生物学杂志,1996(3):19-21.
- [4] ZHANGWX,QIAO ZW,TANG Y Q,et al.Analysis of the fungal community in Zaopei during production of Chinese Luzhou-flavor liquor [J].J Inst Brewing Distilling, 2007,113(1):21-27.
- [5] ZHANG W X, QIAO Z W, SHIGEMATSU T, et al. Analysis of the bacterial community in Zaopei during production of Chinese Luzhou-flavor liquor[J].J Inst Brewing Distilling,2005,111(2):215-218.
- [6] 张文学,乔宗伟,胡承,等.浓香型白酒糟醅中真菌菌群的多样性分析[J].四川大学学报:工程科学版,2006,38(5):97-101.
- [7] 吴生文,章肇敏,曾婷婷,等.架子曲与地面曲培养过程中的差异性分析[J].酿酒科技,2009(3):76-78.
- [8] 施思,张文学,邓宇,等.用 DGGE 技术构建白酒酿造微生物指纹图谱的初步研究[J].中国酿造,2010(1):118-120.
- [9] Muyzer G, De Waal EC, Uitterlinden AG. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gelelec-trophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16SrRNA[J].Applied and Environmental Microbiology,1993,59:695-7001.
- [10] Watanabe K, Teramo toM, Futamata H, et al. Molecular detection, isolation, and physiological characterization of functionally dominant phenol degrading bacteria in activated sludge[J]. Appl. Environ. Microbiol, 1998,64(11):4396-4402.
- [11] Shin Haruta, Shintaro Ueno, Isao Egawa, et al. Succession of bacterial and fungal communities during a traditional pot fermentation of rice vinegar assessed by PCR-mediated denaturing gradient gel electrophoresis[J]. International Journal of Food Microbiology, 2006,109:79-87.
- [12] 陈法霖,张凯,郑华,等.PCR-DGGE 技术解析针叶和阔叶凋落混合物分解对土壤微生物群落结构的影响[J].应用于环境生物学报,2011,17(2):145-150.
- [13] 赵春青,李多川.嗜热子囊菌两个中国新记录种[J].菌物研究,2005,3(1):27-29.
- [14] 董瑞丽,罗惠波,叶光斌,等.浓香型大曲的嗜热真菌[J].中国酿造,2011(4):75-77.

2012 年中国(昆明)国际酒类博览会开幕

本刊讯:2012年中国(昆明)国际酒类博览会开幕式于2012年10月18日在昆明国际会展中心举行。本次博览会以“五洲共聚 开放共赢”为主题,吸引了国内外广大知名酒企前来参展。云南省政协常务副主席管国忠,中国酿酒工业协会副会长王琦出席开幕式。

本届昆明国际酒博会由云南省商务厅主办,云南省酒类行业协会、昆明国际会展中心有限公司、云南日报报业集团、云南省贸促会对外广告展览公司共同承办。

据介绍,在云南省加快桥头堡建设的大背景下,今年的酒博会首次由全国性展会升级为“中国(昆明)国际酒类博览会”,除了国内精品,还吸引了不少欧洲、大洋洲等地的知名红酒企业参会,是云南酒业加快走出去步伐,走向全国乃至世界的良好开端。本次酒博会参展企业300余家,展位400多个,较前四届无论是参展企业数量还是展会规模和质量都有较大的提升。

云南省商务厅副厅长、招商局局长杜勇表示,依托云南独特的自然资源优势以及日趋成熟的国际大通道,此次酒博会搭建了云南酒企同南亚、东南亚和大湄公河次区域的酒企交流合作的平台,相信对扩大云南酒企的国际影响力和品牌知名度,拓展云南美酒东南亚、南亚市场,加快云南酒企业走出去将产生积极推动作用。

此次展会,除全国驰名品牌外,云南本土名品玉林泉、云酒、鹤庆乾酒、澜沧江等也展示了独有的酒文化风采。不少地州酒企业以乡土、民俗为招牌,“土”中见新。从今年1月起开始启动的“云南省第二届十佳名酒”评选揭晓并于18日晚举行了颁奖典礼,玉林泉、醉明月、杨林肥酒、太阳魂等白酒、葡萄酒和其他酒类品牌获得“云南十佳名酒”称号。(小雨)



酒博会剪彩



酒博会展馆场景