

# 酱香型窖泥古菌群落结构的研究

边名鸿<sup>1</sup>, 叶光斌<sup>1</sup>, 杨晓东<sup>1</sup>, 倪斌<sup>2</sup>, 李丹宇<sup>1</sup>

(1.四川理工学院生物工程学院,四川 自贡 643000;2.泸州老窖股份有限公司,四川 泸州 646000)

**摘要:** 采用 ARDRA 免培养手段研究酱香型窖泥中的古菌群落结构,通过对窖泥总 DNA 的提取,扩增古菌 16S rDNA 序列,构建古菌 16S rDNA 文库。随机挑选 39 个阳性克隆子,通过 HhaI 限制性内切酶酶切,选择酶切图谱不同的 25 个克隆子用于后续测序,测序结果与 NCBI 数据库比对分析,获得其分类信息。克隆文库分析结果表明,酱香型窖泥中古菌主要分布于广古菌门中的甲烷袋状菌属(*Methanoculleus*)、甲烷八叠球菌属(*Methanosarcina*)、甲烷鬃毛菌(*Methanosaeta*)和甲烷杆菌属(*Methanobacterium*),分别占 44%、41%、3%、9%。

**关键词:** 酱香型白酒; 窖泥; 古菌; ARDRA; 基因文库

中图分类号: TS262.33; TS261.4; TS261.1; Q93-3 文献标识码: A 文章编号: 1001-9286(2012)08-0051-03

## Research on Archaea Community Structure in the Pit Mud of Maotai-flavor Liquor

BIAN Minghong<sup>1</sup>, YE Guangbin<sup>1</sup>, YANG Xiaodong<sup>1</sup>, NI Bin<sup>2</sup> and LI Danyu<sup>1</sup>

(1. Bioengineering College of Sichuan University of Science & Engineering, Zigong, Sichuan 643000;

2. Luzhou Laojiao Co.Ltd., Luzhou, Sichuan 646000, China)

**Abstract:** The purpose of this research is to study the structure of archaea community in the pit mud of Maotai-flavor liquor through a culture-independent method named ARDRA. The clone species information was collected through extracting total DNA of pit mud, amplifying 16S rDNA sequences of archaea, constructing archaea 16S rDNA library and sequencing. 39 positive clones were selected randomly, and then digested by restrict enzyme HhaI. 25 different clones with different restrict enzyme diagram were selected for subsequent sequencing. Then the classification information of different clone was analyzed by comparing its sequencing results with NCBI database. The analytical results showed that archaea community in pit mud of Maotai-flavor liquor was mainly comprised of *Methanoculleus* (44%), *Methanosarcina* (41%), *Methanosaeta* (3%), and *Methanobacterium* (9%).

**Key words:** Maotai-flavor liquor; pit mud; archaea; ARDRA Clone Library

酱香型白酒又称茅香型白酒,是中国最早的香型白酒,其代表有贵州茅台、四川古蔺郎酒等。近年来酱香型白酒发展较快,呈现出快速发展的良好态势,成为白酒行业一个新的增长点<sup>[1]</sup>。酱香型白酒生产窖池仅在窖底部和顶部用到窖泥,这种特殊的窖池与独特的酿造工艺配套,形成了酱香型白酒独特风格<sup>[2-3]</sup>。窖泥质量取决于窖泥中有益功能菌的数量,各种有益微生物新陈代谢产生的代谢产物赋予了酒体复杂的香味,使其纯净浓郁,绵甜爽口,回味悠长<sup>[4]</sup>。

窖泥中的微生物由细菌、古生菌和真菌组成,它们赋予了白酒的香气<sup>[5]</sup>。并且在特殊的环境中共同作用,以乙醇为发酵底物,经过一系列的生理生化反应,产香生酯,形成了不同香型白酒的典型风格<sup>[6]</sup>。窖泥中微生物绝大

部分为厌氧菌,采用常规的实验室微生物手段分离较为困难。刘玮琦<sup>[7]</sup>等采用 ARDRA 技术,分析了北京和山东寿光两地区蔬菜田土壤细菌群落结构的组成情况。而分子生物学等现代方法用于酱香型窖泥中古菌的研究还相对较少。本实验采用 ARDRA 技术,分析郎酒窖泥中古菌 16S rDNA 核苷酸序列,从而对窖泥中古菌进行分类鉴定,得到窖泥中主要的古菌类群。以期对酱香型白酒的生产工艺改进提供理论支持,从而提高酱香型白酒的酒质及产量,降低生产成本。

### 1 材料与方法

#### 1.1 材料

样品:郎酒窖池底部窖泥。

基金项目 泸州老窖科研奖学金课题 09ljzk06,酿酒及生物技术四川省重点实验室项目(NJ2010-10)。

收稿日期:2012-06-27

作者简介 边名鸿(1979-),女,四川自贡人,讲师,研究生,主要从事发酵工程相关教学与科研工作。

通讯作者:叶光斌(1980-),男,四川自贡人,讲师,博士,主要从事应用微生物相关教学与科研工作。

## 1.2 实验方法

### 1.2.1 窖泥样品总 DNA 的提取及纯化

提取窖泥样品总 DNA 参照文献<sup>[8]</sup>;DNA 的纯化参照 PCR 产物回收试剂盒(购自百泰克生物技术有限公司)的使用方法。

### 1.2.2 16SrDNA 基因片段的 PCR 扩增

本实验要获得古菌 16S rDNA 特异序列片段,选用 Arch21F:5'-TTCCGGTTGATCCY -GCCGGA -3' 和 Arch958R:5'-YCCGGCGTTGAMTCCAATT -3' 作为引物可以扩增出 900 bp 的片段<sup>[9]</sup>,以纯化后窖泥 DNA 为模板,PCR 反应体系为:5.0  $\mu$ L 10 倍缓冲液,4.0  $\mu$ L dNTP,3.0  $\mu$ L Mg<sup>2+</sup>(25 mmol/L),1.0  $\mu$ L 引物 Arch21F,1.0  $\mu$ L 引物 Arch958R,1.0  $\mu$ L DNA 模板,1.0  $\mu$ L rTaq 酶,最后用双蒸水补充至 50  $\mu$ L。PCR 反应程序为:94  $^{\circ}$ C 预变性 5 min,接下来 30 个循环包括 94  $^{\circ}$ C 变性 1 min,58  $^{\circ}$ C 退火 1 min,72  $^{\circ}$ C 延伸 1 min,最后一个循环在 72  $^{\circ}$ C 延伸 10 min。对扩增后 DNA 进行琼脂糖凝胶电泳,检测有无 PCR 产物。

### 1.2.3 古菌 16S rRNA 基因文库的构建及阳性克隆子的验证

通过胶回收试剂盒纯化 PCR 产物,纯化后的产物连接到 pMD19-T Vector 上,再转化到大肠杆菌 DH5a 化学感受态细胞内,涂布于 LA 平板,37  $^{\circ}$ C 培养 16 h 后,用灭菌的牙签随机挑取白色菌落,重新划线于 LA 平板中,以通用引物 M13<sup>+</sup>(5'-AGCGGATAACAATTTACACACAGGA-3')和 M13<sup>-</sup>(5'-CGCCAGG- GTTTTCCAGT-CACGAC-3')为引物,菌落 PCR 验证插入片段的大小是否正确。

### 1.2.4 RFLP 分析及测序

采用 HhaI 限制性内切酶处理菌落 PCR 产物,通过 2.5% 琼脂糖凝胶电泳,分析其酶切图谱的多样性;挑选酶切图谱不同的克隆子,送上海杰李生物技术有限公司测序。

### 1.2.5 测序结果的分析

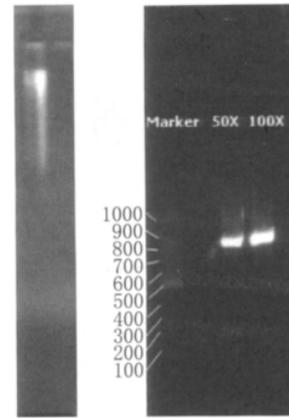
将测得的序列结果通过 NCBI 的 BLAST 搜索程序与 GenBank 中的基因序列进行比对,进而获得同源性分析结果,初步确定酱香型窖泥中古菌的主要类型。

## 2 结果与分析

### 2.1 窖泥总 DNA 提取及 16S rDNA 序列扩增结果

用 PCR 产物回收试剂盒对窖泥总 DNA 纯化,并进行 16S rDNA 序列扩增,均采用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测,结果见图 1。

由图 1 可以知道,以纯化后窖泥总 DNA 为模板,进



注:其中左图为纯化后总 DNA 琼脂糖凝胶电泳图像,右图为 16S rDNA PCR 扩增的琼脂糖凝胶电泳图像。

图 1 窖泥总 DNA 提取及扩增

行 16S rDNA 序列的 PCR 扩增产生了 900~1000 bp 的 DNA 片段。

### 2.2 菌落 PCR 及酶切结果

菌落 PCR 完成后,对 PCR 结果进行 1% 琼脂糖凝胶电泳检测。检测发现,扩增后产生的 DNA 片段大小处于 900~1000 bp。将大小正确的阳性克隆子的菌落 PCR 产物通过 HhaI 限制性内切酶酶切,用浓度为 2.5% 的琼脂糖凝胶检测酶切结果,见图 2。

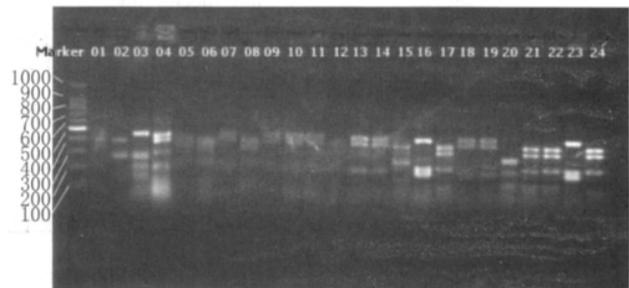


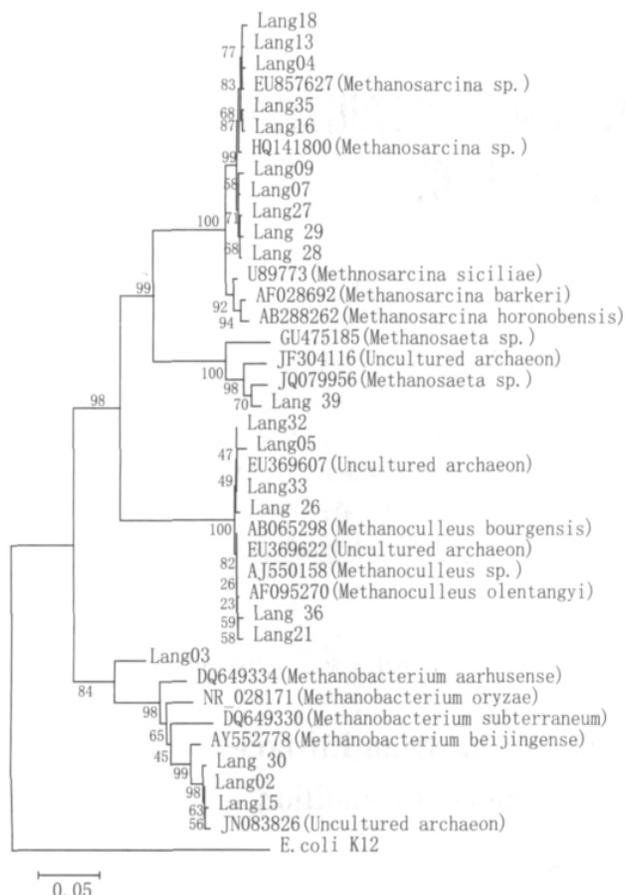
图 2 部分郎酒窖泥古菌文库 RFLP 图谱

### 2.3 系统发育树的构建及古菌克隆文库的分析

对所测序列进行拼接,去除载体片段,得到目标序列。将序列上传至 NCBI,与数据库进行比对,得到各克隆子的种属信息。根据比对结果可以知道,克隆子在进化上的亲缘关系。将各序列用 DNA star 软件进行处理后,用 Clustalx、MEGA 4 进行系统发育树的构建,结果见图 3。

对克隆子进行比对分类,结果表明,郎酒窖泥中的古菌属于广古菌门中的甲烷杆菌纲和甲烷微菌纲。克隆子分类及相应克隆子数目见表 1。

以上结果初步确定了酱香型窖泥中古菌的主要类型,它们分布于广古菌门中的甲烷杆菌纲和甲烷微菌纲中(对照古菌分类表)。其中,属于甲烷杆菌纲的克隆子有 2 号、15 号、30 号克隆子,占 9%,它们均属于甲烷杆菌



注:图中“Lang 02”代表 02 号克隆子,“Lang 03”代表 03 号克隆子,以此类推。

图 3 酱香型窖泥中古菌 16S rDNA 基因文库克隆子系统发育树

表 1 对比后克隆子分类及相应克隆子数目

类别	分类信息	克隆子数
一类	<i>Methanosarcina</i> (甲烷八叠球菌属)	14
二类	<i>Methanosaeta</i> (甲烷鬃菌属)	1
三类	<i>Methanoculleus</i> (甲烷袋状菌属)	15
四类	<i>Methanobacterium</i> (甲烷杆菌属)	3
五类	其他(疑似 <i>Methanobacterium</i> )	1

纲,甲烷杆菌目,甲烷杆菌科,甲烷杆菌属;属于甲烷微菌纲的有 04 号、05 号、07 号、09 号、13 号、16 号、18 号、21 号、26 号、27 号、28 号、29 号、32 号、33 号、35 号、36 号、39 号克隆子,占 91%。其中 05 号、21 号、26 号、32 号、33 号、36 号克隆子属于甲烷微菌目,甲烷微菌科,甲烷囊菌属,占 44%;04 号、07 号、09 号、13 号、16 号、18 号、27 号、28 号、29 号、35 号菌属于甲烷八叠球菌目,甲烷八叠球菌科,甲烷八叠球菌属,占 41%;39 号菌属于甲烷八叠菌目,甲烷鬃菌科,甲烷鬃菌属,占 3%。

### 3 讨论

研究表明,窖泥中的产甲烷菌与己酸菌之间是互利

共生关系,在厌氧环境下存在着厌氧细菌间的“种间氢转移”关系<sup>[10]</sup>,1964 年,茅台试点发现窖底香为己酸乙酯,从窖泥、黄水中分离出己酸菌及甲烷杆菌,并证实它们是共栖关系;1981 年,文君酒厂发现导入甲烷气体可以提高己酸乙酯的含量,说明甲烷菌及所产气体对浓香型白酒生产有重大意义<sup>[5]</sup>;孙家芳研究发现,甲烷菌与己酸菌共酵时,产生低沸点的甲烷气体,能够带走大量热量,抑制杂菌繁殖,使发酵按照理想的温度缓慢进行,提高发酵效率,增加产量和酒质<sup>[11]</sup>。

本实验通过对郎酒底部窖泥进行总 DNA 提取,扩增 16S rDNA,构建克隆文库并进行测序、构建发育树图谱分析等手段,可以初步推断出各类古菌的存在状况:均是产甲烷菌,以甲烷微菌纲居多,甲烷杆菌纲相对较少;其中甲烷八叠球菌属、甲烷囊菌属较多,甲烷杆菌属次之,甲烷鬃菌属最少。本课题组通过免培养技术对酱香型白酒窖泥中古菌进行研究,目前发现在酱香型白酒窖底泥中的古菌均为产甲烷菌,证实了前人关于窖泥中存在甲烷菌的研究结果。甲烷菌在酱香型白酒窖泥中的广泛存在,也反映出产甲烷菌在酿造酱香型白酒的生产中具有重要意义。

### 参考文献:

- [1] 杨涛,梁明锋,李国友,等.微生物技术在酱香型白酒生产中的应用研究[J].酿酒科技,2011(4):20-28.
- [2] 熊子书.中国三大香型白酒的研究(二)酱香·茅台篇[J].酿酒科技,2005(4):25-30.
- [3] 张武举,刘宝贵.半石半泥筑窖、浓酱同步发酵、生产麸曲兼香型白酒[J].酿酒,1992(6):18-20.
- [4] 廖昶,吴生文,黄小晖,等.特香型酒功能窖泥和普通窖泥理化指标对比分析[J].酿酒科技,2010(2):86-90.
- [5] 周恒刚.关于窖泥微生物(上)[J].酿酒科技,1987(1):2-6.
- [6] 张东跃,沈才洪,敖宗华,等.人工窖泥老熟程度的研究进展[J].酿酒科技,2012(4):98-101.
- [7] 刘玮琦,茆振川,杨宇红,等.应用 16S rDNA 基因文库技术分析土壤细菌群落的多样性[J].微生物学报,2008(10):1344-1350.
- [8] Zhou J Z, Bruns MA, Tiedje J M. DNA recovery from soils of diverse composition[J]. Appl Environ Microbiol, 1996, 62: 316-322.
- [9] Wang P., Xiao X., Wang FP. Phylogenetic diversity of archaea in deep-sea sediments of west pacific warm pool.[J]. Extremophiles. 2005, 9: 209-217.
- [10] 沈怡方.关于己酸菌的培养及其应用[J].酿酒科技,1998(4):17-23.
- [11] 孙家芳.关于甲烷菌与己酸菌发酵调节发酵温度加快新窖老熟的探讨[J].山东食品发酵,2003(4):23-24.