

窖泥微生物总 DNA 的提取纯化研究

黄永光¹, 黄平¹, 涂华彬²

(1.贵州省轻工业科学研究所, 贵州 贵阳 550002 2.贵州茅台酒厂(集团)公司, 贵州 仁怀 564501)

摘要: 窖泥是产生白酒中香味物质的功能菌的生长繁殖载体, 白酒中的呈香呈味物质主要是由窖泥微生态中的己酸菌、丁酸菌、甲烷菌等代谢产生和酯化生化反应生成。从窖泥中提取微生物总 DNA, 经纯化、PCR 扩增等处理分析, 可跟踪检测不同时期、不同轮次发酵后窖泥中的各菌种、菌群的变化, 对养窖护窖、发酵过程控制、提高发酵糟醅质量和酒质等生产都具有指导意义。

关键词: 白酒; 微生物; 窖泥; DNA; 提取; 纯化

中图分类号: TS262.3; Q93-33; TS261.4 文献标识码: B 文章编号: 1001-9286(2004)03-0041-02

Research on Extraction & Purification of Total DNA of Microbes in Pit Mud

HUANG Yong-guang¹, HUANG Ping¹ and TU Hua-bin²

(1.Guizhou Provincial Light Industry Science Research Institute, Guiyang, Guizhou 550002;

2.Guizhou Maotai Group Co., Renhuai, Guizhou 546501, China)

Abstract: Pit mud was regarded as the carrier for propagation and growth of functional bacteria and functional bacteria could produce flavoring substances in liquor. The aroma-producing substances in liquor were developed mainly through the metabolic and esterifying action and biochemical actions of caproate bacteria, butyrate bacteria and methane bacteria etc. in pit mud. Microbial DNA, extracted from pit mud and treated by purification and PCR treatment etc., could be used in tracing detection of bacterial species and bacterial groups changes in pit mud in different periods or in different fermentation stages. The application of this method could guide pits maintenance, fermentation control, and improvement of fermented grains quality and liquor quality etc. in practice. (Tran. by YUE Yang)

Key words: liquor; microbes; pit mud; DNA; distill; purification

窖池是白酒生产的生态设备, 具有特殊性。窖池中的窖泥是产生白酒中香味物质的功能菌的生长繁殖载体。白酒中的呈香呈味物质的生成主要与窖泥有关, 窖泥微生态中的微生物多样性极为复杂, 如窖泥中含有己酸菌、丁酸菌、甲烷菌、甲烷氧化菌、丙酸菌及嗜热芽孢杆菌等。这些微生物在特殊的生境中繁殖、代谢, 产生各种酶和代谢产物, 酶和代谢产物进一步发生酯化生化反应生成白酒的呈香呈味物质, 形成白酒中的有效质量成分。

从窖池不同部位的窖泥中提取微生物总 DNA 是保证酒醅正常发酵的非常有效的方法, 可应用于不同时期、不同轮次发酵起窖后对窖池窖泥微生物生态的跟踪检测, 对发酵过程中的目标菌群的变化及其在每次发酵过程中的行为功能做到清楚的检测评价。从而更进一步揭示发酵过程中窖泥微生物生态系统中的微生物基因多样性及其随每批发酵糟醅不同的理化指标在发酵过程中的变化而变化的具体情况。因此, 该技术将会成为未来提高白酒质量所必须进行的关键研究课题。窖池中窖泥微生物的多样性非常复杂, 微生物数量及种类对提高发酵糟醅的质量起着核心作用, 对发酵过程各种酶的形成和变化也起核心作用, 直接影响发酵速率、发酵过程中菌体生长、菌体得率。所以应用从发酵窖池中的窖泥中提取微生物总 DNA, 再进行 DNA 纯化处理, 得出随发酵过程的进行, 发酵窖池微生物生态系统的变化和菌种及菌群演替动态, 并将其应用于白酒酒糟发酵、窖池管理, 从而提高白酒质量, 具有十分明显的经济效益, 同时对推进白酒行业的技术进步也具有举足轻重的意义。

1 材料与方法

收稿日期: 2004-02-26

作者简介: 黄永光(1976-), 男, 大学, 工程师, 发表论文数篇。

1.1 窖泥样品采集

每批糟醅发酵结束后, 从各窖池的不同部位采集不同的窖泥。一般取样为同一窖中, 窖底泥取四角和中间窖泥, 窖壁泥根据不同高度采样(酱香型除外); 为了较全面研究发酵过程窖内微生态及微生物种类、数量变化, 还可对不同深度的窖泥及封窖窖泥进行采样分析。

1.2 窖泥样感官指标标识

对从不同微生境采集的窖泥样进行感官指标标识, 如窖泥的色、香、水分等感官指标的记录, 以用作结合后面具体的 DNA 检测结果进行综合研究分析微生物总 DNA 中的特殊性菌种、菌群。

1.3 窖泥 DNA 的提取方法^[1]

1.3.1 窖泥 DNA 的提取

称取干水后的窖泥样品 5 g, 加入 14 ml DNA 提取液中, 提取液配比为 100 mmol/L Tris-HCl, 100 mmol/L EDTA, 100 mmol/L Na₃PO₄, 1.5 mmol/L NaCl, 1% 的 CTAB 的混合液, 混合液 pH 为 8.0; 再向加入窖泥样品后的混合液中加入 100 μl 蛋白酶 K (10 mg/ml), 38 °C 225 r/min 摇床上摇动 30 min; 再加入 1.5 ml 20% 的 SDS, 65 °C 水浴 2 h, 水浴加热中进行多次搅动, 于室温下 6 kgf 离心 10 min, 提取上清液, 转至 50 ml 离心管中。向剩余的窖泥沉淀中加入 5 ml 提取液和 0.5 ml 20% 的 SDS, 涡旋 10 s, 65 °C 水浴 10 min, 同样 6 kgf 室温离心 10 min, 收集上清液, 将两次上清液混合。将混合后的上清液与等体积的氯仿——异戊醇(比例为 24:1)混合、离心, 吸取上清液转移至 50 ml 离心管中, 加入 0.6 倍体积的异丙醇室温沉淀 1.5 h, 16 kgf 离心 20 min, 收集核酸沉淀, 再用 70

%酒精洗涤沉淀,置于灭菌的蒸馏水中,定容为500 ml。

1.3.2 窖泥中G⁺菌DNA的提取

对窖泥中的G⁺菌进行过夜培养,离心收集菌体,无菌水洗涤,再置于等体积的无菌水中。吸取悬浮菌体的悬浮液1 ml加入5 g灭菌土壤中,摇床振荡吸附30 min后提取DNA。

1.3.3 DNA定量分析

对提出的DNA进行定量分析,采用λDNA(0.6 μg/μl)作标准,与提取的DNA同时电泳后,经溴化乙锭染色后,再用TANON凝胶分析软件进行分析。

1.4 窖泥DNA的纯化

1.4.1 纯化方法

一般采用透析袋电洗脱纯化回收法^[2]。

1.4.2 纯化回收率的计算

吸取20 μl(0.06 μg/μl)的标准λDNA,将用透析袋电洗脱纯化回收法得来的DNA与标准DNA同时电泳后用TANON软件进行分析,计算回收率。

1.5 窖泥微生物DNA的提取率

选取不同的窖泥样品,于121℃湿热灭菌1 h,提取灭菌土壤的DNA检查灭菌情况。用E.coliDH5α隔夜培养,再离心收集菌体,无菌水洗涤3次,后悬浮于等体积的无菌水中,取1 ml菌悬液于5 g灭菌土壤中,摇床振荡吸附30 min后提取。同时设置常规纯菌作为对照样实验,处理样和对照样均设置3个重复。将提取后的DNA量与各处理的DNA对照比较,计算提取率。提取率计算公式=处理的提取量/对照提取量×100%。

1.6 纯化后的窖泥微生物总DNA的PCR扩增^[3]

由于窖泥中的微生物多样性中存在显著性与微量性差异^[4],可通过PCR(polymerase chain reaction)快速扩增特异DNA片段。在PCR扩增反应体系中模板(窖泥DNA)10 μl;TaqDNA聚合酶2.5 u,反应最适温度为72℃。PCR扩增的具体参数为:(1)95℃变性10 min;(2)退火温度95℃ 2 min,48℃ 30 s,72℃ 5 min,38个循环;(3)延伸温度72℃ 20 min。

表1 不同窖泥中微生物分布情况 (10⁴个/g干土)

细菌数	老窖	中龄窖	新窖	老窖/新窖
细菌总数	104.1	39.3	33.7	3.1
好气细菌数	17.3	11.0	12.1	1.4
兼气细菌数	86.3	28.4	21.6	4.0
兼气菌/好气菌	5.0	2.6	1.8	
芽孢杆菌总数	46.1	21.6	20.5	2.3
好气芽孢菌数	9.9	5.2	6.5	1.5
兼气芽孢菌数	36.2	16.4	14.0	2.6
兼气芽孢菌/好气芽孢菌	3.6	3.1	2.1	—

1.7 窖泥中目标菌DNA的提取灵敏度

窖泥中目标菌DNA的提取,窖泥采用主体菌的选择性培养基过夜培养,离心收集菌体,无菌水洗涤3次,按10⁻¹~10⁻⁸进行系列稀释,各稀释度分别取1 ml加入5 g灭菌土壤中,摇床30 min,然后提取DNA进行纯化。目标主体菌DNA的PCR扩增操作与1.6所述类似。PCR反应参数为:变性温度95℃ 2 min;退火95℃,1 min,45℃ 1.5 min,72℃ 2.5 min,38个循环;延伸72℃ 8 min。

2 结果和分析

2.1 不同窖池窖泥中微生物DNA的提取

采用SDS高盐提取法能从不同窖泥中提取微生物总DNA,但由于必须对窖泥进行灭菌处理,在灭菌处理过程中菌体核酸被分解,所以不能提取到,因此不能得到不同窖泥提取的总DNA的琼脂糖凝胶电泳详细图谱,但用SDS法提取窖泥微生物总DNA,有利于对微生物菌体进一步的分析。同时,窖泥中的微生物总DNA的提取量还与窖泥中的有机质含量有关,因为DNA的提取量与有

机质量呈正相关,相关系数>0.9。

2.2 窖泥微生物DNA的提取效率

由于各窖池窖泥的微生物不同,窖泥理化生化特性不同,所以窖泥总DNA的提取效率也会有较大差异,同一窖池中的不同部位的窖泥总DNA也会有差异。

2.3 微生物DNA的纯化

2.3.1 纯化回收率:用20 μl的标准λDNA(0.06 μg/μl),经透析袋回收得X μg DNA,则纯化回收率为X/(20×0.06)×100%。

2.3.2 窖泥DNA的PCR扩增:由于窖池为极端环境,窖泥中的有机物、腐植酸等对DNA的提取有影响,所以得经过纯化,去除腐植酸等的干扰,利于进一步的研究。

3 讨论

窖池中的窖泥是发酵微生物的生境,其具有特殊性,加上微生物菌群的多样性,所以对窖泥中的微生物分析方法采用常规的平板计数法,生物量测定法等很难实现测定结果的准确性,与窖泥中微生物菌群的动态有很大的差异。应用土壤微生物群体基因组研究其多样性及功能是一种有效的方法,并已在国内外广受关注^[5]。从DNA的角度分析窖泥中微生物的关键是DNA的提取。从土壤或从其洗涤物中提取DNA的方法有两种^[6]:一种是在土壤中直接裂解微生物体,再提取DNA^[7]。另一种是先将微生物菌体与土壤分开,再提取DNA^[8]。方法一的提取率较高,其关键步骤有:(1)菌体细胞的裂解和粗DNA的提取;(2)粗DNA的纯化。用破碎菌体等物理方法进行粗DNA的提取和纯化所得的DNA片段一般较小。

窖泥微生物DNA提取方法的效率及其灵敏度对于研究发酵窖池中窖泥的微生物多样性及其活动功能是十分重要的。只有能高效提取才能具有代表性和实用性,SDS高盐提取法对窖泥中微生物DNA的提取是有效的。

Bakken等^[9]的研究表明,土壤中土著性细菌平均DNA含量为1.6~2.4 fg/细胞,以此为基点对发酵窖池中窖泥中的微生物总DNA提取测定符合研究目的和应用方向,具有明显的研究和经济价值。因此采用群体基因组学的方法研究窖泥中的微生物具有独特的优势和作用,更进一步将该方法应用于白酒糟发酵过程微生物群落及单体群落的发酵动力学研究,实现对白酒窖池发酵质量的监控,对提高发酵质量和白酒质量都具有很好的前景。

参考文献:

- [1] Zhou J Z, Bruns M A, Tiedje J M. DNA recovery from soils of diverse composition [J]. *Appl Environ Microbiol*, 1996, 62:316-322.
- [2] J 萨姆布鲁克, E F 弗里齐, T 曼尼阿蒂斯. 分子克隆实验指南(第二版) [M] 北京: 科学出版社, 1998.
- [3] 瞿礼嘉, 顾红雅, 胡苹, 陈章良. 现代生物技术导论 [M] 北京: 高等教育出版社, 1998.
- [4] 沈怡方. 白酒生产技术全书 [M] 北京: 中国轻工业出版社, 1998.
- [5] Vigdis T, Lise O. Microbial diversity and function in soil: from genes to ecosystems [J]. *Ecology and industrial microbiology*, 2002, (5)240-245.
- [6] Laurag G L, James R, Dana J, et al. Comparison of methods of DNA extraction from stream sediments [J]. *Appl Environ Microbiol*, 1995, 59:1141-1143.
- [7] Tsai Y L, Olson B H. Rapid method for separation of bacterial DNA from humic substances in sediments for polymerase chain reaction [J]. *Appl Environ Microbiol*, 1991, 57:1070-1074.
- [8] Jacobsen C S, Rasmussen O F. Development and application of the new method to extract bacterial DNA from soil based on separation of bacteria from soil with cation-exchange resin [J]. *Appl Environ Microbiol*, 1992, 58:2458-2462.
- [9] Bakken L R, Olsen R A. DNA content of soil bacteria of different cell size [J]. *Soil Biol Biochem*, 1989, 21(6):789-793.