

叶光斌,董瑞丽,王彩虹,等. 基于免培养法的中高温大曲细菌群落结构研究[J]. 江苏农业科学,2013,41(8):333-336.

# 基于免培养法的中高温大曲细菌群落结构研究

叶光斌<sup>1,2</sup>, 董瑞丽<sup>3</sup>, 王彩虹<sup>1</sup>, 王毅<sup>1</sup>, 熊俐<sup>1</sup>, 罗惠波<sup>1,2</sup>, 沈才萍<sup>4</sup>

(1. 四川理工学院生物工程学院, 四川自贡 643000; 2. 酿酒生物技术及应用四川省重点实验室, 四川自贡 643000; 3. 四川省攀枝花市产品质量监督检验所, 四川攀枝花 617000; 4. 泸州老窖股份有限公司, 四川泸州 646000)

**摘要:**通过构建细菌 16S rRNA 基因克隆文库、测序及构建系统发育树,对泸州老窖中高温大曲的细菌群落结构进行了研究。结果表明:中高温大曲的细菌组成较为丰富,且大部分与可培养的细菌类群相关,主要分布于芽孢杆菌纲、梭菌纲以及放线菌纲。其中芽孢杆菌纲内克隆子多样性最为丰富,主要包括乳杆菌属、乳球菌属、魏斯氏菌属、芽孢杆菌属、明串珠菌属、片球菌属和高温放线菌属;放线菌纲内克隆子分布于糖多孢菌属;梭菌纲内克隆子分布于 *Symbiobacterium* 和一个属级分类地位未知的梭菌纲内。中高温大曲内细菌的优势种群为魏斯氏菌(占全部克隆子比例的 30.35%, 2 OTUs)、高温放线菌(28.57%, 2 OTUs)和乳杆菌(19.65%, 6 OTUs)。

**关键词:**中高温大曲;免培养法;细菌;16S rRNA 基因文库

**中图分类号:** Q936 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2013)08-0333-04

“曲为酒之骨”,中高温大曲作为浓香型白酒发酵的糖化、发酵剂,含有多种微生物及酶类,在浓香型白酒发酵过程中具有重要的作用。早期学者对于大曲微生物的研究主要集中在采用传统微生物培养方法对大曲中可培养微生物进行分离、鉴定、利用,以及针对大曲发酵过程中可培养微生物的菌群演替规律的研究等方面。近年来,随着分子生物学的迅猛发展,分子生物学很快被引入到大曲微生物生态学的研究当中。胡佳等利用 DGGE 及 16S rRNA 基因克隆文库技术,研究了中高温大曲内细菌微生物的群落组成<sup>[1]</sup>;高亦豹等通过 PCR-DGGE 技术比较分析了不同香型大曲的微生物群落组成,发现了很多未见报道的微生物类群<sup>[2-3]</sup>;罗惠波等通过 SSCP、Biolog 技术分析了大曲发酵过程中微生物的群落动态变化规律<sup>[4-5]</sup>。泸州老窖生产用曲是浓香型大曲的典型代表,在白酒行业具有较为广泛的市场,本研究以泸州老窖生产用曲为研究对象,通过构建细菌 16S rRNA 基因克隆文库、测序及系统发育树分析技术,确定大曲中细菌种群组成,从而为后期功能微生物的分离及应用提供基础数据。

## 1 材料与与方法

### 1.1 样品采集与 DNA 提取

中高温大曲采集自泸州老窖的生产用曲。DNA 提取采用改良自 Zhou 等的 DNA 提取方法<sup>[6]</sup>,简要的提取步骤如下:(1)称取 3~5 g 大曲置于灭过菌的碾钵内,加入石英砂和液氮反复研磨 3 次后,收集到 30 mL 灭菌的离心管内;(2)加入 13.5 mL DNA 抽提缓冲液(100 mmol/L Tris-HCl, 100 mmol/L EDTA-Na<sub>2</sub>, 100 mmol/L 磷酸钠缓冲液,

1.5 mol/L NaCl, 1% CTAB, 调 pH 值至 8.0)重悬,放置于 37 °C 摇床中 225 r/min 水平振荡 30 min;(3)加入 3 mL 10% SDS,在 65 °C 温浴 15 min,之后将离心管置于 -80 °C 超低温冰箱放置 15 min,再将离心管转移到 65 °C 水浴锅放置 15 min,如此重复 3 次,以促进细胞破裂;(4)4 °C 下 6 000 g 离心 10 min,上清转移到新的 30 mL 离心管中;(5)加等体积酚-氯仿-异丙醇(体积比 25:24:1),剧烈振荡 5 min,静置 10 min 后,13 000 g 离心 20 min;(6)将上层水相移入新的离心管,加入 0.6 倍体积异丙醇,于室温沉淀 1 h;(7)室温下 13 000 g 离心 20 min,弃上清;(8)用枪吸除残余的异丙醇液体,加入 1 000 μL 70% 乙醇,并转移至 2 mL 离心管内,静置 10 min,4 °C 下 13 000 g 离心 15 min;(9)重复以上 1 次;(10)弃上清,用枪吸除残余的乙醇,置于超净台吹风 10 min,除尽乙醇,直到不能闻到乙醇气味;(11)加入 50~100 μL 无菌双蒸水,放置到 65 °C 水浴锅水浴 1 h,促进 DNA 的溶解。粗提的大曲 DNA 通过 PCR 产物纯化试剂盒(OMEGA 公司)纯化,纯化后的 DNA PCR 扩增效果良好。

### 1.2 细菌 16S rRNA 基因克隆文库的构建与测序

引物对 Eub27F(5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3')/Eub1492R(5'-CGGTTACCTGTTCAGACTT-3')用于细菌 16S rRNA 基因的扩增<sup>[7]</sup>。PCR 扩增条件为:94 °C 变性 4 min;94 °C 变性 45 s,55 °C 退火 45 s,72 °C 延伸 60 s,30 个循环;72 °C 延伸 10 min。为了防止 PCR 偏差,混合 3 次重复的 PCR 产物,通过胶回收柱(OMEGA 公司)回收纯化,纯化后的 PCR 产物连接到 pMD-18T 载体(TaKaRa 公司)上,再转化到大肠杆菌 DH5α 感受态细胞内,涂布于 LA 平板;37 °C 培养 16 h 后,用灭菌的牙签随机挑取克隆子划线于新的 LA 平板上。再通过菌落 PCR 确定阳性克隆子,引物对 UP I(5'-GGAAACAGCTAAGACCATG-3')/UP II(5'-TTGGGTA-ACGCCAGGT-3')用于菌落 PCR 扩增,扩增程序同上。随机挑取 58 个细菌阳性克隆子送往上海杰李生物技术有限公司进行测序,将测序结果通过 DNAMAN 软件进行比对,统计相同或相似序列的数目。

收稿日期:2013-07-24

基金项目:四川省教育厅重大培育项目(编号:09ZZ015);四川理工学院人才引进项目(编号:2010XJKR001);酿酒生物技术及应用四川省重点实验室开放课题(编号:NJ2010-05、NJ2011-05)。

作者简介:叶光斌(1980—),男,安徽池州人,博士,讲师,从事酿酒生物技术及应用的教学与研究。E-mail:guangbin1980@126.com。

### 1.3 克隆文库的统计分析 & 系统发育树的构建

通过 Bellerophon 软件在线去除嵌合体序列 (<http://comp-bio.anu.edu.au/bellerophon/bellerophon.pl>)。对于 16S rRNA 基因序列,采用序列相似性大于等于 97%,定义为同一 OTU (operational taxonomic units, 运算的分类单位)<sup>[8]</sup>。每个 OTU 选取 1 个代表克隆子序列与 NCBI (美国国立生物信息中心) 数据库 (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) 进行比对,查找近似微生物或环境克隆子分类信息和序列信息 (一般选择有参考文献的序列)。选取各 OTU 代表克隆子及网上数据库比对的近似序列构建系统发育树,通过 Clustal X (Version 1.87) 软件对齐序列后,再通过 MEGA 4 软件构建系统发育树。21 个细菌克隆子的 16S rRNA 基因序列已上传至 NCBI 的 GenBank 数据库,序列号为 KF444925 ~ KF444945。

采用文库覆盖率方法、Shannon - Wiener 指数、Simpson 指数、Buzas - Gibson 均一度指数和稀释曲线 (Rarefaction Curve) 对所建文库进行评估。其中文库覆盖率通过文献<sup>[9]</sup>的方法计算; Shannon - Wiener 多样性指数、Simpson 多样性指数、Buzas - Gibson 均一度指数和稀释曲线通过 PAST 软件 (<http://folk.uio.no/ohammer/past/>) 计算获得<sup>[9]</sup>。稀释曲线通过软件 Sigma Plot 11.0 绘制。

## 2 结果与分析

### 2.1 克隆文库的评估

细菌 16S rRNA 基因克隆文库的测序结果表明,细菌克隆文库内物种多样性较为丰富,在所分析的 58 个阳性克隆子中,有 2 个嵌合体,同源性小于 97% 的克隆子达到 19 类。细菌文库覆盖率达到 66.07% (表 1),从稀释曲线 (图 1) 可以看出,细菌 16S rRNA 基因克隆文库未达到饱和。尽管未能完整获得大曲内所有细菌的种群组成信息,但该数据基本反映了浓香型中高温大曲内主要细菌的群落组成,具有一定参考价值。

### 2.2 中高温大曲细菌群落结构的分析

表 1 中高温大曲细菌 16S rRNA 基因克隆文库物种多样性和丰富度评估

文库类型	文库覆盖率 (%)	Shannon - Wiener 指数	Simpson 指数 (1 - D)	Buzas - Gibson 均一度指数
细菌 16S rRNA 基因	66.07	2.47	0.88	0.62

注:一般 Shannon - Wiener 指数越高,则文库所含克隆子多样性越高; Simpson 指数 (1 - D) 越接近 1,则文库所含克隆子多样性越高; Buzas - Gibson 均一度指数越接近 1,则文库中克隆子分布越平均<sup>[9]</sup>。

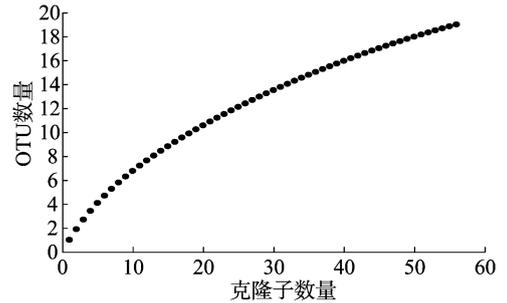


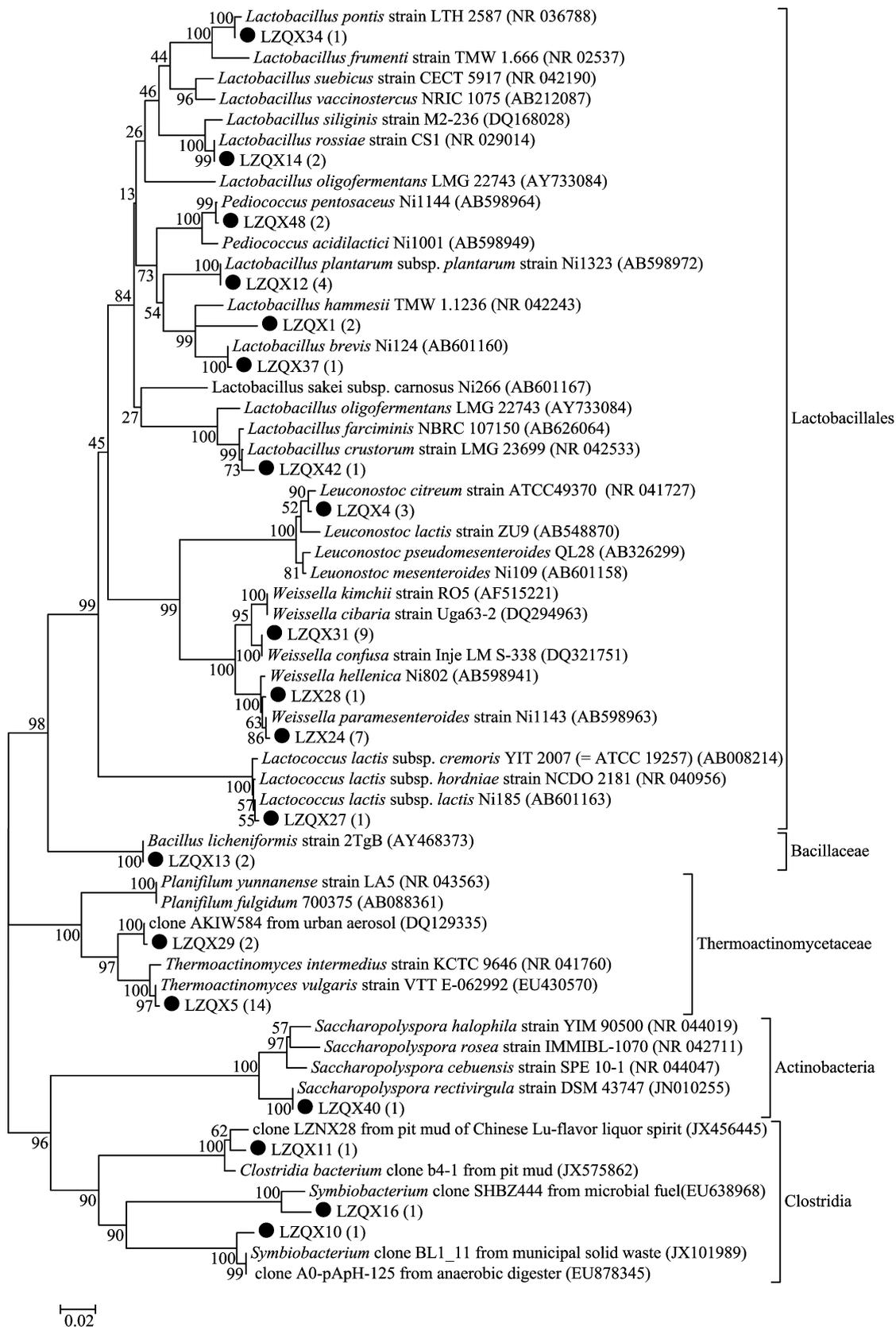
图 1 中高温大曲细菌 16S rRNA 基因克隆文库的稀释曲线

每个 OUT 的代表克隆子的分布及比对信息见表 2。从比对结果中可以看出:克隆子与参比序列间相似度较高,为 96% ~ 99%,它们大多数与可培养微生物相关。共有 19 个代表克隆子参与构建系统发育树,通过分析系统发育树及克隆子比对信息,可以很直观地看出大曲内细菌群落主要分布于芽孢杆菌纲、梭菌纲及放线菌纲。其中芽孢杆菌纲克隆子多样性最为丰富,共有 15 OTUs,克隆子数目约占全部克隆子总数的 92.8%,且大多数克隆子属于乳杆菌目分类单元下的属种 (图 2),如魏斯氏菌属 (*Weissella confusa*, *W. paramesenteroides*)、乳杆菌属 (*Lactobacillus crustorum*, *L. plantarum*, *L. pontis*, *L. rossiae*)、乳球菌属 (*Lactococcus lactis* subsp. *lactis*)、明串珠菌属 (*Leuconostoc* spp.)、片球菌属 (*Pediococcus pentosaceus*)。

表 2 中高温大曲细菌 16S rRNA 基因文库内测序克隆子比对信息

编号	数目	比例 (%)	长度 (bp)	相似率 (%)	近似序列号	分类信息
LZQX - 24	8	14.28	1 536	98	AB598963	<i>Weissella paramesenteroides</i>
LZQX - 31	9	16.07	1 538	99	DQ321751	<i>Weissella confusa</i>
LZQX - 5	14	25.00	1 510	99	EU430570	<i>Thermoactinomyces vulgaris</i>
LZQX - 29	2	3.57	1 507	99	DQ129335	<i>Thermoactinomycetaceae</i> sp.
LZQX - 42	1	1.79	1 529	99	NR_042533	<i>Lactobacillus crustorum</i>
LZQX - 12	4	7.14	1 528	99	AB598972	<i>Lactobacillus plantarum</i>
LZQX - 34	1	1.79	1 537	99	NR_036788	<i>Lactobacillus pontis</i>
LZQX - 37	1	1.79	1 527	99	AB601160	<i>Lactobacillus brevis</i>
LZQX - 1	2	3.57	693	96	JX398133	<i>Lactobacillus brevis</i>
LZQX - 14	2	3.57	1 535	99	FJ476119	<i>Lactobacillus rossiae</i>
LZQX - 4	1	1.79	1 512	96	NR_041727	<i>Leuconostoc citreum</i>
LZQX - 43	2	3.57	700	97	AB601158	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>
LZQX - 27	1	1.79	1 509	99	AB601163	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>
LZQX - 13	2	3.57	1 512	99	AY468373	<i>Bacillus licheniformis</i>
LZQX - 48	2	3.57	1 538	99	AB598964	<i>Pediococcus pentosaceus</i>
LZQX - 16	1	1.79	1 495	97	EU638968	<i>Symbiobacterium</i> sp.
LZQX - 10	1	1.79	1 502	97	JX101989	<i>Symbiobacterium</i> sp.
LZQX - 11	1	1.79	1 480	98	JX456445	<i>Clostridiales</i> sp.
LZQX - 40	1	1.79	1 496	99	JN010255	<i>Saccharopolyspora rectivirgula</i>

注:克隆子 LZQX - 43 由于只测引物 Eub1492r 端序列,故未将其纳入系统发育树的分析。



系统发育树采用Mega 4软件的邻接法(Neighbor-Joining),Jukes-Cantor模式下自举1 000次获得;图中带有“●”标记的为本次研究获得的克隆子序列,括号内数值为该类型的克隆子数目。

图2 中高温大曲细菌克隆子16S rRNA基因系统发育树

其余的类群包括地衣芽孢杆菌(*Bacillus licheniformis*)、高温放线菌属(*Thermoactinomyces vulgaris*)和一个属级分类地位未知的高温放线菌科细菌。梭菌纲克隆子主要分布于 *Symbiobacterium* 属内和一个属级分类地位未知的梭菌纲细菌。放线菌纲克隆子分布于糖多孢菌属(*Saccharopolyspora* spp.)。总体而言,中高温大曲内的优势微生物为魏斯氏菌(占全部克隆子比例的30.35%,2 OTUs)、高温放线菌(28.57%,2 OTUs)和乳杆菌(19.65%,6 OTUs)。

目前已有许多关于中高温大曲细菌菌群组成的报道,其中高亦豹等通过 PCR-DGGE 技术比较了不同香型大曲样品(其中包括中高温大曲样品:汤沟大曲和剑南春大曲)内的细菌群落组成,结果表明大曲内细菌优势种群为魏斯氏菌和乳杆菌,且 *Thermoactinomyces sanguinis* 仅存在于高温大曲中<sup>[2-3]</sup>。而胡佳等利用 DGGE 及 16S rRNA 基因克隆文库对于中高温大曲内细菌微生物群落组成的研究认为:变形杆菌亚门的 *Delftia* 和 *Pseudomonas*、放线菌门的 *Nocardiopsis* 和 *Arthrobacter*、拟杆菌门的 *Dysgonomonas* 以及部分不可培养的  $\beta$ -Proteobacteria、拟杆菌门细菌是大曲内的优势种群<sup>[1]</sup>。本试验结果中关于大曲优势细菌为魏斯氏菌、乳杆菌的这一结论与 Wang 等的结论<sup>[3]</sup>较为一致;所不同的是,在具体的细菌微生物属种组成上存在一定差异。此外,在我们的样品中还存在较高比例的高温放线菌的分布,且主要是普通高温放线菌(*Thermoactinomyces vulgaris* 和 *Thermoactinomyces* sp.),这可能是由于2组数据所研究的样品、试验方法等的不同而导致的。

由于本次研究获得的克隆子信息大多与可培养微生物近似,因此有必要具体分析这些微生物在白酒酿造中的生态学功能。从图2可以看出,乳杆菌目的克隆子包括 *Weissella confusa*、*W. paramesenteroides*、*Lactobacillus crustorum*、*L. plantarum*、*L. pontis*、*L. rossiae*、*Lactococcus lactis* subsp. *lactis*、*Leuconostoc* spp.、*Pediococcus pentosaceus* 这些具有产乳酸能力的乳酸菌类群,初步推断这些微生物可能来源于小麦或稻草。高亦豹等对于浓香型大曲及白酒酒醅内细菌的研究中均报道了 *Weissella* 和 *Lactobacillus* 类群的存在<sup>[2-3,10]</sup>,本研究结果与其较为一致;此外刘莉萌等报道了片球菌(*Pediococcus*)在窖泥内的分布,表明大曲是浓香型白酒乳酸发酵的菌种来源,且部分窖泥片球菌可能来源于大曲<sup>[11-12]</sup>。浓香型白酒生产强调“增己降乳”,沈怡方对于大曲内乳酸菌的论述也认为乳酸含量可以多少反映曲质,且提高大曲发酵的品温可以减少乳酸菌含量<sup>[13]</sup>。本研究结果表明中高温大曲内乳酸菌是优势种群,且以杆菌为主,因此有必要在大曲生产中通过提高制曲品温等配套措施以控制乳酸菌的生长。

此外,本研究中发现高温放线菌属在所研究的大曲内也存在较高分布。高温放线菌属由于具有菌丝体等形态学特征,在早期的分类中将其归入放线菌目;然而基于16S rDNA 序列分析、G+C比等其他分子生物学研究结果,且具有内生孢子(含有二吡啶羧酸),目前有学者建议将该属并入枯草杆菌菌群<sup>[14]</sup>。其中 *Thermoactinomyces vulgaris* 最早报道时就发现该菌具有较强耐高温和产淀粉酶的能力<sup>[15]</sup>。高亦豹等的数据表明,高温放线菌属只存在于高温大曲内<sup>[2-3]</sup>;结合本研究结果,有理由相信高温放线菌属和芽孢杆菌的分布与大曲

制曲温度存在一定关系,制曲品温越高,则高温放线菌属和芽孢杆菌的分布越丰富。

### 3 结论

通过构建中高温大曲细菌16S rRNA 基因克隆文库、测序和系统发育树分析,较为系统地研究了泸州老窖成品大曲的细菌微生物群落结构,研究结果表明:乳酸菌(魏斯氏菌和乳杆菌)和高温放线菌是中高温大曲内细菌的优势种群。后期的工作应集中在如下几点:一,针对乳酸菌和高温放线菌,设计相关培养基,进行分离、培养及代谢性质的研究,确定其在白酒固态发酵过程中的具体作用。二,比较不同地区、不同季节、不同香型大曲间微生物的差异,以研究地域、季节、制曲工艺等对大曲微生物组成的影响。通过以上数据的整合和比较研究可以帮助我们在理解“曲定香型”等方面提供理论依据。三,在大曲质量评判上,重新评估大曲酸度指标(或者乳酸含量指标)对大曲质量评判的重要性。

### 参考文献:

- [1] 胡佳,邓斌,张文学,等. 浓香型白酒曲药中细菌组成及系统学分析[J]. 酿酒科技,2007(5):17-19.
- [2] 高亦豹,王海燕,徐岩. 利用 PCR-DGGE 未培养技术对中国白酒高温和中温大曲细菌群落结构的分析[J]. 微生物学通报,2010,37(7):999-1004.
- [3] Wang H Y, Gao Y B, Fan Q W, et al. Characterization and comparison of microbial community of different typical Chinese liquor Daqus by PCR-DGGE[J]. Letters in Applied Microbiology, 2011, 53:134-140.
- [4] 罗惠波,黄治国,李浩,等. 浓香型大曲原核微生物群落的 PCR-SSCP 解析[J]. 微生物学通报,2009,36(9):1363-1367.
- [5] 罗惠波,黄治国,李浩,等. 浓香型大曲微生物群落代谢多样性研究[J]. 西南大学学报:自然科学版,2009,31(7):180-184.
- [6] Zhou J Z, Bruns M A, Tiedje J M. DNA recovery from soils of diverse composition[J]. Appl Environ Microbiol, 1996, 62:316-322.
- [7] Lane D J. Nucleic acid techniques in bacterial systematics[M]. New York: Wiley, 1991:115-175.
- [8] McCaig A E, Glover L A, Prosser J I. Molecular analysis of bacterial community structure and diversity in unimproved and improved upland grass pastures[J]. Appl Environ Microbiol 1999, 65:1721-1730.
- [9] 叶光斌,王风平,肖湘. 东太平洋中国多金属结核区锰结核样品中微生物群落结构的研究[J]. 台湾海峡,2010,29(2):218-227.
- [10] 王海燕,张晓君,徐岩,等. 浓香型和芝麻香型白酒酒醅中微生物菌群的研究[J]. 酿酒科技,2008(2):86-89,91.
- [11] 刘莉萌,张斌,东秀珠,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):22-24,28.
- [12] 王茂,赵辉,陈凤阁. 浓香型白酒窖泥中乳酸菌的分离与初步鉴定[J]. 酿酒科技,2006(4):29-31.
- [13] 沈怡方. 白酒生产技术全书[M]. 北京:中国轻工业出版社,2009:47.
- [14] 李文均,张忠泽,姜成林. 高温放线菌属分类研究进展[J]. 微生物学报,2002,42(6):759-763.
- [15] Kuo M J, Hartman P A. Isolation of amylolytic strains of thermoactinomyces vulgaris and production of thermophilic actinomycete amylases[J]. Journal of Bacteriology, 1966, 92(3):723-726.