

基于 PCR-DGGE 的浓香型 白酒窖泥细菌群落结构研究^①

黄治国, 刘燕梅, 卫春会, 罗惠波, 邓杰,
王艳丽, 祝云飞, 李觅, 黄俊

四川理工学院 酿酒生物技术及应用四川省重点实验室, 四川 自贡 643000

摘要: 以 30, 100 和 200 年窖龄窖泥为样品, 采用 PCR-DGGE 技术探索不同窖龄窖泥细菌类群及群落演变规律. 结果表明: 不同窖泥样品 DGGE 图谱均出现 14~23 条较清晰的条带, 其中共有优势条带为第 4, 11, 19 号, 优势度均在 2% 以上. 多样性指数在 2.21~2.58 之间, 且随窖龄的增加而呈现增加趋势; 相似性指数在 0.427~0.629 之间. 30 年与 200 年窖泥细菌群落聚为一类, 相似性指数最高, 达 0.629. 30 年与 100 年窖泥细菌群落相似性指数最低, 为 0.427. PCR-DGGE 图谱优势条带测序结果显示: 它们属于煎盘梭菌、耐乳酸杆菌、梭菌目细菌、*Uncultured bacterium*、丁酸梭菌、瘤胃球菌属、酪丁酸梭菌、醋酸杆菌属.

关键词: 窖泥; 细菌类群; PCR-DGGE; 16S rDNA 序列

中图分类号: TS201.3

文献标志码: A

文章编号: 1673-9868(2014)8-0167-06

我国酿酒历史悠久, 酒文化源远流长, 传统工艺精湛, 产品风格独特, 在世界蒸馏酒中独树一帜. 浓香型白酒的生产是以窖池与酒醅为载体, 来自环境、大曲和窖泥的微生物经历复杂的物质与能量代谢的过程. 窖泥微生物经过长期的驯化和发展, 慢慢形成了自身独特的微生物群落, 其代谢物是浓香型白酒窖香的基础^[1]. 窖泥是白酒功能微生物的生长及繁殖的载体, 在浓香型白酒的生产中有着极为重要的作用.

自然环境中的微生物仅有 0.1%~10% 是可培养的, 所以常规微生物培养技术难以揭示微生物群落多样性的特征^[2]. PCR-DGGE 技术在定性研究微生物群落多样性及动态变化规律方面已取得了一定成效^[3-8], 黄治国等^[9]利用 PCR-DGGE 技术分析了浓香型白酒窖泥古菌群落结构. 本研究借助 PCR-DGGE 技术对不同窖龄窖泥中细菌微生物群落结构进行分析, 并对优势条带进行测序鉴定, 可望对不同窖龄窖泥中细菌类微生物群落的构成有更深入的认识, 从而为了解微生物群落结构、构建窖池微生物资源数据库提供更多准确的数据, 也为研究浓香型白酒窖池发酵过程中各种主要微生物作用机理奠定理论基础.

① 收稿日期: 2014-04-30

基金项目: 四川省科技厅应用基础项目(07JY029-026); 酿酒生物技术及应用四川省重点实验室开放基金项目(NJ2012-06, 2013-08); 地方高校国家级大学生创新创业训练计划项目(201210622014).

作者简介: 黄治国(1978-), 男, 四川广安人, 博士, 副教授, 主要从事发酵工程的研究.

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 材料

30 年窖龄、100 年窖龄和 200 年窖龄浓香型白酒窖池窖底泥, 采自泸州老窖股份有限公司罗汉生产基地, 于窖底中心取样, 迅速用冰盒运回实验室, 于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保藏。

1.1.2 药品试剂

Taq DNA 聚合酶(大连宝生物), 引物(上海英潍捷基), 去离子甲酰胺(德国 AppliChem), TEMED (BBI), 过硫酸铵(Promerga), 双丙烯酰胺(BBI)。

1.1.3 仪器设备

PCR 仪(美国 BIO-RAD My cycle); DGGE 电泳仪(美国 BIO-RAD); 高速冷冻离心机(美国 Thermo X1R); 凝胶成像系统(美国 BIO-RAD ChemiDoc XRS+)。

1.2 实验方法

1.2.1 DNA 提取

采用 SDS-酚氯仿抽提法^[10]提取不同窖龄窖泥微生物基因组 DNA, 然后用 DNA 产物纯化试剂盒(NDA Purificationg Kit)纯化粗提 DNA, DNA 浓度和纯度利用核酸检测仪检测合格后保藏于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 备用。

1.2.2 PCR 扩增

选用通用引物 968GCF-1401R 扩增细菌 16S rDNA V6-V8 区^[11], 扩增目的片断约为 470 bp. PCR 反应体系为 50 μL : 34.0 μL 灭菌双蒸水, 5.0 μL 10 $\times$ buffer, 4.0 μL dNTPs Mixture(2.5 mmol/L), 3.0 μL MgCl_2 (25 mmol/L), 上下游引物(10 $\mu\text{mol/L}$)各 1.0 μL , 1.0 μL Taq 酶(5 U/ μL), 1.0 μL 模板 DNA (100 ng/L)。

1.2.3 扩增片段变性梯度凝胶电泳

加入 8 μL 6 $\times$ loading buffer 混匀在 50 μL PCR 产物中, 取 18 μL 加入 30%~55%(100%的变性剂为 7 mol/L 的尿素和 40%的去离子甲酰胺)梯度变性聚丙烯酰胺凝胶的加样孔中, 60 $^{\circ}\text{C}$ 在 1 $\times$ TAE 电泳液中电泳, 先用 200V 电泳 5 min, 然后用 120 V 电泳 14 h, 银染后拍照。

1.2.4 DGGE 图谱分析

本研究主要使用丰度(S)、shannon-wiener 多样性指数(H)和样品间相似性指数(Cs)来表示群落多样性。DGGE 图谱通过 quantity one 软件进行分析。

样品丰度(S)由电泳条带反应; Shannon-Wiener 多样性指数^[12]反映群落种类和均匀度, 种类之间的均匀性增加多样性相应提高; 相似性用索伦森配对相似性系数(Sorenson Pairwise Similarity Coefficient)^[13]来表述。

1.2.5 DGGE 优势条带回收及测序

DGGE 电泳后染色, 选取优势条带进行回收。回收条带经 PCR 鉴定后连入 PGM-T 载体, 转化 *E. coli* DH5 α 感受态细胞, 蓝白斑筛选, 挑取阳性克隆送上海英潍捷基公司测序。

2 结果与分析

2.1 窖泥细菌 16S rRNA V6-V8 区基因的获取

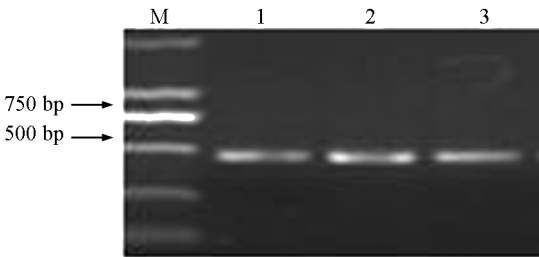
利用引物 EUB-968GC 和 EUB-1401 对样品微生物总 DNA 进行 PCR 扩增后, 结果发现: 扩增 DNA 片段均在 470 bp 左右, 表明 PCR 扩增产物符合引物设计, 为目的片段(图 1)。

2.2 窖泥细菌 16S rRNA V6-V8 区基因 DGGE 电泳图谱

对不同窖龄窖泥细菌 16S rDNA V6-V8 区 PCR 扩增产物进行 DGGE 电泳分析，结果发现：所有样品均出现 14~23 条比较清晰的条带，表明各样品 16S rDNA PCR 扩增产物通过 DGGE 得到较好的分离(图 2)。

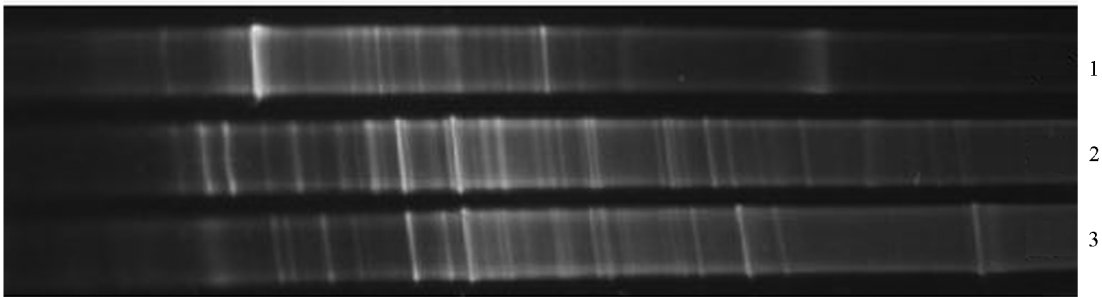
2.3 DGGE 图谱丰度及优势度分析

DGGE 图谱的丰度及优势度分析结果发现：随着窖龄的增加，丰度总体上呈现增加趋势，表明随着窖龄的增加，微生物类群呈增加趋势。其中第 4,11,19 号条带在所有的样品中均有检出，且优势度均在 2%以上，表明这些条带所代表的细菌类群在窖池微生物中起着重要作用(表 1)。



1: 30 年; 2: 100 年; 3: 200 年.

图 1 不同窖龄及地域窖池窖泥细菌 PCR 扩增结果



1: 30 年; 2: 100 年; 3: 200 年.

图 2 不同窖龄窖泥细菌 DGGE 电泳图谱

2.4 DGGE 图谱的多样性指数分析

样品多样性指数越高，微生物群落结构变化越大，微生物多样性就越高。DGGE 图谱多样性指数分析结果表明：不同窖龄窖泥细菌多样性指数都在 2.21~2.58 之间(表 2)，说明不同窖龄窖池中细菌群落变化速度较慢，随着窖池不断延续发酵而慢慢驯化，其微生物群落结构也逐渐丰富而达到动态平衡，这也是优质白酒的主要成因之一。

表 1 不同窖龄窖池窖泥细菌条带优势度

样品	30 年	100 年	200 年	样品	30 年	100 年	200 年
丰度	15	14	23	丰度	15	14	23
1	/	/	2.615	13	0.618	1.609	1.873
2	/	/	0.529	14	/	2.413	2.216
3	/	/	1.943	15	2.469	/	1.752
4	20.378	11.269	15.641	16	/	1.163	10.938
5	/	/	2.736	17	5.925		0.977
6	/	/	0.419	18	1.935	3.981	1.542
7	0.521	10.241	0.579	19	1.471	32.512	3.057
8	1.418	3.737	2.513	20	0.366	0.215	8.797
9	3.248	1.304	6.963	21	14.361	0.431	0.244
10	1.399	0.809	1.489	22	0.868	0.899	0.384
11	2.77	5.534	2.909	23	/	/	1.399
12	2.117	/	3.584				

注：/为未检出。

表 2 窖池窖泥多样性指数

样品	30 年	100 年	200 年
H 值	2. 21	2. 22	2. 58

2.5 DGGE 图谱的相似性指数分析

DGGE 图谱相似性分析结果表明：不同窖龄窖泥样品的相似性较低，30 年和 100 年 DGGE 图谱相似性最低，为 0. 427；30 年和 200 年 DGGE 图谱相似性最高，为 0. 629（表 3）. 利用相似性数据构建聚类图：第 2,3 号样品聚为一大支，1 号单独聚为一支(图 3).

表 3 不同窖龄窖池细菌群落间的 Cs 值

样品	200 年	100 年	30 年
200 年	1		
100 年	0. 482	1	
30 年	0. 629	0. 427	1

2.6 DGGE 部分优势条带回收测序鉴定结果

DGGE 电泳结束染色后选取了 8 个优势条带(分别为 30 年 4 号、12 号，100 年 8 号、10 号，200 年 1 号、2 号、3 号、6 号)进行回收(如图 2). PCR 鉴定后(图 4)，纯化并连接到 PGM-T 载体上，载体转化到 *E. coli* DH5 α 感受态细胞中，通过蓝白斑筛

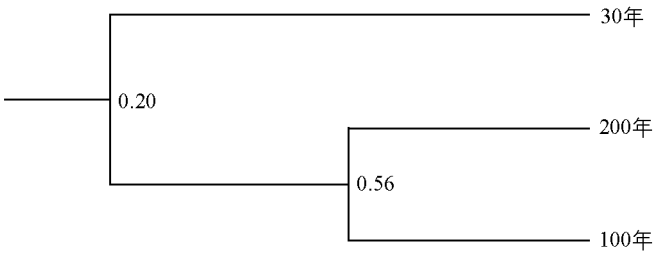
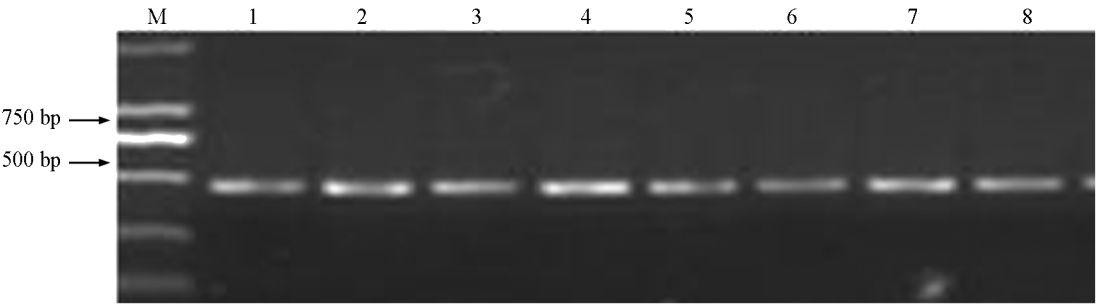


图 3 不同窖龄窖池窖泥细菌群落相似性系数树状图

选每个切胶条带挑取约 3 个阳性单克隆送上海英潍捷基公司进行测序. 经 NCBI 比对后得结果(表 4)，其相似率基本上大于 95%，比对结果显示的 8 个条带所代表的细菌基本上都属于杆菌类，包括常见的醋酸杆菌、丁酸梭菌等，同时也有窖泥中未培养出的瘤胃球菌、煎盘梭菌.

从表 1 可以看出，1,2,3,6 号条带仅在 200 年窖池中才有，这说明窖泥微生物经过长期的驯化发展，其微生物群落结构多样性更高. 其中 1,2,6 号分别与煎盘梭菌(*Clostridium sartagoforme strain*)、耐乳酸杆菌(*Lactobacillus acetotolerans strain*)和丁酸梭菌(*Clostridium butyricum strain*)都有 99%的相似性，3 号条带为一种未培养细菌. 所有窖龄窖池中都检测到的条带为 4,8,10，分别与梭菌目细菌(*Clostridiales bacterium*)、瘤胃球菌属(*Ruminococcus sp*)和酪丁酸梭菌(*Clostridium tyrobutyricum strain*)有 95%，94%和 99%的相似性. 12 号条带仅出现在 30,200 年的窖泥样品中，它与醋酸杆菌属(*Eubacteriaceae bacterium*)有 100%的相似性.



1—8 分别代表 1—4, 6, 8, 10, 12 号条带回收后 PCR 扩增产物.

图 4 细菌 DGGE 切胶回收重新 PCR 电泳图

表 4 细菌 16S rRNA V3 区基因 DGGE 优势条带测序鉴定结果

条带号	相似率	菌 株
1	99	<i>Clostridium sartagoforme strain</i> (煎盘梭菌)
2	99	<i>Lactobacillus acetotolerans strain</i> (耐乳酸杆菌)
3	96	<i>Uncultured bacterium</i>
4	95	<i>Clostridiales bacterium</i> (梭菌目细菌)
6	99	<i>Clostridium butyricum strain</i> (丁酸梭菌)
8	94	<i>Ruminococcus sp</i> (瘤胃球菌属)
10	99	<i>Clostridium tyrobutyricum strain</i> (酪丁酸梭菌)
12	100	<i>Eubacteriaceae bacterium</i> (醋酸杆菌属)

3 讨 论

本试验通过采用 PCR-DGGE 及测序技术全面且客观地认识了不同窖龄窖泥细菌群落构成及多样性变化趋势,随着窖龄的增加细菌多样性增大,且驯化程度越来越高,群落结构越来越稳定.在浓香型白酒的香气成分中,脂类物质占主要成分,其中己酸乙酯、乳酸乙酯、乙酸乙酯和丁酸乙酯称为四大酯类^[14].在浓香型白酒的发酵过程中,乳酸菌不仅代谢产生乳酸、乙酸、乙醇、CO₂等产物,为丙酸菌等的代谢提供碳源;丁酸菌代谢可产生丁酸,丁酸的累积又可利于己酸菌将丁酸转化为己酸,同时丁酸菌代谢过程中产生的氢,可以被甲烷菌及硝酸盐还原菌利用,可以解除其代谢产物氢的抑制现象;醋酸菌是强氧化性的好氧性细菌,可以将乙醇氧化成乙酸^[15].而已酸、乳酸、乙酸、丁酸在白酒呈味中有着重要的作用,因此这些菌的代谢产物对白酒质量有着重要的意义.

参考文献:

[1] 黄治国,甄攀,罗惠波.浓香型白酒窖池古菌群落研究[J].西南大学学报:自然科学版,2010,32(12):91—95.

[2] 许文涛,郭星,罗云波,等.微生物菌群多样性分析方法的研究进展[J].食品科学,2009,30(7):258—265.

[3] 高淑静,吴凤芝.PCR-DGGE技术在土壤微生物多样性研究中的作用[J].生物信息学,2007,5(4):174—175.

[4] 宫曼丽,任南琪,邢德峰.DGGE/TGGE技术及其在微生物分子生态学中的应用[J].微生物学报,2004,44(6):845—847.

[5] 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.

[6] 王海英,张文学,施思,等.水井坊窖底泥微生物群落结构的DGGE分析[J].中国酿造,2012,31(2):38—40.

[7] 林海龙,李伟光,闫险峰,等.中药废水污泥群落结构解析中PCR-DGGE引物的选择与评价[J].环境科学,2011,32(5):1505—1510.

[8] 孟镇,熊正河,钟其顶,等.应用PCR-DGGE技术解析白酒大曲细菌群落结构[J].食品与发酵工业,2010,36(16):159—162.

[9] 黄治国,赵斌,卫春会,等.香型白酒窖泥古菌群落结构研究及其系统发育学分析[J].现代食品科技,2014,30(3):28—32.

[10] 赵兴青,杨柳燕,陈灿,等.PCR-DGGE技术用于湖泊沉积物中微生物群落结构多样性研究[J].生态学报,2006,26(11):3610—3616.

[11] OLGA SANCHEZ, JOSEP M GASOL, RAMON MASSANA, et al. Comparison of Different Denaturing Gradient Gel Electrophoresis Primersets for the Study of Marine Bacterioplankton Communities[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2007, 73(18): 5962—5967.

[12] ZOETENDAL E G, AKKERMANS A D L, DE VOS W M. Temperature Gradient Gel Electrophoresis Analysis of 16S rRNA from Human Fecal Samples Reveals Stable and Host-Specific Communities of Active Bacteria[J]. Appl Environ Microb, 1998, 64(10): 3854—3859.

- [13] MUYZER G, DE WAAL E C, UITIERLINDEN A G. Profiling of Complex Microbial Populations by Denaturing Gradient Gel Electrophoresis Analysis of Polymerase Chain Reaction-Amplified Genes Coding for 16S rRNA [J]. Appl Environ Microb, 1993, 59(3): 695—700.
- [14] 沈怡方. 白酒生产技术全书 [M]. 北京: 中国轻工业出版社, 1998.
- [15] 侯小哥, 王俊英, 李学思, 等. 浓香型白酒窖池主要功能性微生物的研究进展 [J]. 酿酒科技, 2013(2): 96—106.

A PCR-DGGE-Based Study on Bacteria Community Structure of Pit Mud of Luzhou-Flavor Liquor

HUANG Zhi-guo, LIU Yan-mei, WEI Chun-hui, LUO Hui-bo,
DENG Jie, WANG Yan-li, ZHU Yun-fei,
LI Mi, HUANG Jun

Sichuan Key Laboratory of Liquor Making Bio-Technology & Application, Sichuan University of
Science & Engineering, Zigong Sichuan 643000, China

Abstract: Samples of pit mud with a cellar age of 30, 100 and 200 years were analyzed with PCR-DGGE (polymerase chain reaction-denaturing gradient gel electrophoresis) to investigate the bacteria clusters in them and their succession. Fourteen to 23 distinct DGGE bands were detected in the samples, of which Bands 4, 11 and 19 were dominant, with a dominance degree of $>2\%$. The diversity index tended to increase with increasing cellar age, varying between 2.21 and 2.58. Their similarity indexes ranged between 0.427 and 0.629. The bacteria communities in 30-year-old pit mud and in 200-year-old pit mud were clustered into one group, for they had the highest similarity index (0.629). The bacteria communities in 30-year-old pit mud and in 100-year-old pit mud had the lowest similarity index (0.427). The PCR-DGGE advantages bands tapping results showed that they belonged to *Clostridium sartagoforme*, *Lactobacillus acetotolerans*, *Clostridiales bacterium*, *Clostridium butyricum*, *Ruminococcus sp.*, *Clostridium tyrobutyricum* and *Eubacteriaceae bacterium*.

Key words: pit mud; bacteria community; PCR-DGGE; 16S rDNA sequence

责任编辑 周仁惠

