

浓香型白酒窖泥古菌群落结构研究及其系统发育学分析

黄治国, 赵斌, 卫春会, 邓杰, 刘燕梅, 黄俊, 游辉, 唐宇梅

(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: 本试验分别提取 30、100 和 200 年窖龄窖泥样品总 DNA, 采用 PCR-DGGE 和 16S rDNA 测序技术探索浓香型白酒不同窖龄窖泥古菌群落演替规律, 结果表明: 不同窖龄窖泥的古菌 DGGE 图谱均出现 14~17 条较清晰的条带, 其中第 4、7、11 号条带在所有样品中均有检出, 且优势度较高, 均在 4% 以上; 不同窖龄窖泥的古菌群落多样性指数都在 1.91~2.29 之间, 且随窖龄的增加而呈现上升趋势; 不同窖龄窖泥的古菌相似性指数在 0.43~0.61 之间, 30 年与 100 年窖泥古菌群落相似性指数达到了 0.61 且聚为一类, 与 200 年古菌群落相似性指数相比较却分为两类。PCR-DGGE 图谱优势条带割胶测序结果显示: 他们分属于产甲烷古菌 (*Methanogenic archaeon*)、甲烷袋状菌属 (*Methanoculleus sp.*)、甲烷八叠球菌属 (*Methanosarcinales archaeon*)、瘤胃古菌属 (*Rumen archaeon*) 四个类群。本研究结果对浓香型白酒窖泥古菌群落有了一定的认识。

关键词: 窖泥; 古菌类群; 16SrDNA 序列; 系统发育学

文章篇号: 1673-9078(2014)3-28-32

Community Structure and Phylogenetic Diversity Analysis of Archaeal in the Mud Pit

HUANG Zhi-guo, ZHAO Bin, WEI Chun-hui, DENG Jie, LIU Yan-mei, HUANG Jun, YOU Hui, TANG Yu-mei
(Sichuan University of Science & Engineering, Liquor Making Bio-Technology & Application of Key Laboratory of Sichuan Province, Zigong 643000, China)

Abstract: The clusters and succession rules of archaeal in the mud pit was studied by PCR-DGGE and sequencing of 16S rDNA. The total DNAs were extracted from the mud pit with cellar age of 30, 100 and 200 years, respectively. The results showed that 14 to 17 clear bands were displayed in each grain sample from DGGE grams, among which band 4, 7 and 11 were detected and showed relatively high dominant degree above 4% in all samples. The diversity indexes of all samples were between 1.91 and 2.29, with the increase of cellar age showed an increasing trend. The similarity indexes of samples were between 0.43 and 0.61. Meanwhile, the similarity index between 30 years and 100 years was reached to 0.61. Therefore, they were clustered into one group, compared with 200 years which was divided into two groups. The PCR-DGGE dominant bands tapping results showed that the archaeal belonged to *Methanogenic archaeon*, *Methanoculleus sp.*, *Methanosarcinales archaeon* and *Rumen archaeon*.

Key words: pit mud; archaeal community; 16SrDNA sequence; phylogenetic

中国具有悠久的酒文化历史, 五粮液、泸州老窖等浓香型白酒以“窖香浓郁, 绵甜醇厚、香味协调, 回味悠长”的产品风格特征为广大消费者所喜爱, 其窖香物质的来源主要是窖泥微生物在发酵过程中产生的有机酸和酯类等代谢产物。长期的生产实践表明, 窖池泥土中复杂的微生物群落与浓香型白酒中复杂的

收稿日期: 2013-11-07

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课题 (NJ2009-05、NJ2012-06); 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, 博士, 副教授, 研究方向为发酵工程

呈香呈味物质形成直接相关, 与产品质量和酒体风格有着十分密切的关系^[1]。在浓香型白酒生产中, 糟醅在窖池内发酵周期长达 60 d 以上。通常情况下, 发酵 2~3 周后, 窖池内就处于厌氧状态, 乙醇浓度达到 5~6% 及以上, pH 值缓慢下降到 3~4^[2]。在长期不间断的生产过程中, 窖泥一直处于相对稳定和特殊的生态环境中, 其中的微生物在持续且相对稳定选择压下可能逐渐趋于稳定且具备一定的特殊性。

窖泥中的微生物由细菌、古菌和真菌组成, 它们赋予了白酒的香气成分。目前, 从窖泥中分离的微生物主要以细菌为主, 有芽孢杆菌属、芽孢乳杆菌属、

假单胞菌属、微杆菌属、棒状杆菌属、黄杆菌属、梭菌属等,而从窖泥中分离培养古菌十分困难,黄治国等^[3]运用 PCR-SSCP、施思等^[4]运用 PCR-DGGE、王明跃等^[5]应用 PCR-ARDRA 和 16S rDNA 克隆测序技术进行研究,对白酒窖泥古菌优势种群结构特征有了一定的认识,但缺乏古菌种属层面的分类研究,对窖泥古菌群落结构及多样性尚未形成系统性的认识,因此对古菌的研究对白酒的生产有着重要的意义,并且可以考虑将甲烷菌作为窖泥质量评价和检测的重要指标菌之一。本试验利用 PCR-DGGE 和 16S rDNA 测序技术研究不同窖龄窖泥古菌群落结构的变化规律,为中国白酒的生产提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

窖泥样品分别取自泸州老窖低龄窖(30年)、中龄窖(100年)和高龄窖(200年)窖池的窖底泥,于窖底中心取样,迅速用冰盒运回实验室,于-20℃保藏。

1.2 主要试剂和仪器

Taq DNA聚合酶,大连宝生物;去离子甲酰胺,德国AppliChem;TEMED,双丙烯酰胺(BBI),过硫酸铵(Promerga);Taq DNA聚合酶,大连宝生物工程有限公司;PCR仪,美国BIO-RAD公司My cycle;DGGE电泳仪,美国BIO-RAD公司;高速冷冻离心机,德国hettich公司UNIVERSAL 32R;凝胶成像系统,美国SIM公司Bio-Best200E。

1.3 总DNA的提取及PCR扩增

采用试剂盒与直接裂解法相结合的方法,用SDS-酚氯仿抽提法^[6]提取窖泥微生物基因组DNA,然后用NDA Purification Kit快速DNA产物纯化试剂盒纯化粗提DNA,然后用核酸蛋白仪检测DNA的浓度和纯度,置于-20℃备用。

Alper T. Akarsubasi^[7]等对古菌16S rDNA V3区用上游引物ARCH46F与下游引物ARCH1017R进行扩增,得到950 bp左右的DNA片段,再以其PCR产物为模板,使用上游引物PARCH344F与下游引物UNIV522R进行嵌套式PCR扩增,扩增目的片断大小约为190 bp;PCR反应体系为50 μL: 34.0 μL灭菌双蒸水, 5.0 μL 10×buffer, 4.0 μL dNTPs Mixture (2.5 mmol/L), 3.0 μL MgCl₂ (25 mmol/L), 引物 I、II (10 μmol/L) 各1.0 μL, 1.0 μL Taq酶 (5 U/μL), 1.0 μL模板DNA (100 ng/L)。

1.4 变性梯度凝胶电泳

加入 8 μL 6×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℃下在 1×TAE 电泳液中电泳,先用 200 V 电泳 5 min,然后用 120 V 电泳 14 h,银染然后拍照。

1.5 DGGE 图谱软件分析

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。具体过程如下:

(1) 丰度(S): 即 DGGE 图谱中条带的个数。

(2) Shannon-Wiener 多样性指数^[8]: 即反映群落种类与均匀度的混合参数;同样,种类之间个体分配的均匀性增加也会使多样性提高。

$$H = -\sum_{i=1}^s p_i \ln p_i$$

式中, H 为 Shannon-Wiener 多样性指数; p_i 为第 i 个条带的优势度; S 为每一个泳道的丰度值。

(3) 相似性用索伦森配对相似性系数(Sorenson Pairwise Similarity Coefficient)^[9]来计算:

$$Cs = 2j / (a + b)$$

式中, Cs 为索伦森配对相似性系数; a 为某一样品的 DGGE 图谱的条带数目; b 为另一样品的 DGGE 图谱的条带数目; j 为两个泳道所共有条带的数目。

1.6 窖泥古菌 DGGE 图谱优势条带切胶回收及鉴定

DGGE 电泳结束染色后选取优势条带进行切胶回收。切胶回收条带经 PARCH344F 和 UNIV522R 重新 PCR 后,将二次 PCR 产物进行纯化并连接到 PGM-T 载体上,载体转化到 E. coli DH5α 感受态细胞中,通过蓝白斑筛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。

1.7 窖泥古菌系统发育学分析

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 DNASTAR 软件进行处理后,利用 ClustalX 1.83 和 Mega 4.0 软件,

采用邻接法 (Neighbor-Joining) 建构系统发育树。

2), 符合引物设计的片段。

2 结果与分析

2.2 窖泥古菌 DGGE 图谱

2.1 窖泥古菌 16S rRNA V3 区基因的获取

对不同窖龄窖泥古菌 16S rDNA V3 区 PCR 扩增产物进行 DGGE 电泳分析, 结果发现: 所有样品均出现 14~17 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 3)。

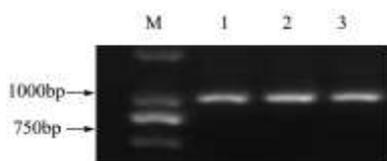


图1 窖泥古菌 16S rDNA PCR 扩增结果

Fig. 1 Agarose gel electrophoresis of archaea 16S rRNA V3 regions

注: 1:30 年窖泥; 2:100 年窖泥; 3:200 年窖泥。

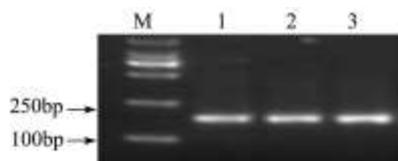


图2 窖泥古菌 16S rDNA PCR 扩增结果

Fig. 2 Agarose gel electrophoresis of archaea 16S rRNA V3 regions

注: 1:30 年窖泥; 2:100 年窖泥; 3:200 年窖泥。

用核酸蛋白仪测定 DNA 浓度的结果显示所提取 DNA 的 A_{260}/A_{280} 值均在为 1.8~2.0 之间。用上游引物 ARCH46F (5-YTAAGCCATGCRAAGT-3) 与下游引物 ARCH1017R (5-GGCCATGCACCWCCTCTC-3) 进行扩增, 得到 1000 bp 左右的 DNA 片段 (图 1), 再以其 PCR 产物为模板, 使用上游引物 PARCH344F (5-GACGGGGHGCAGCAGGCGCGA-3) 与下游引物 UNIV522R (5-GWATTACCGCGGCKGCTG-3) 进行嵌套式 PCR 扩增, 得到 190 bp 左右的 DNA 片段 (图

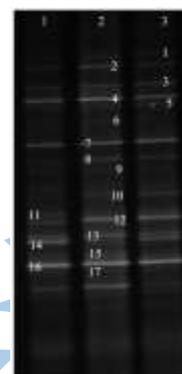


图3 窖泥古菌群落 PCR-DGGE 图谱

Fig. 3 DGGE analysis of archaea in mud pit of different years

注: 1:30 年窖泥; 2:100 年窖泥; 3:200 年窖泥。

2.3 窖泥古菌 DGGE 图谱丰度及优势度变化规律

本试验分析了 DGGE 图谱中古菌丰度及优势度的变化规律, 结果表明: 随着窖龄的增加, 丰度总体上是呈现先增加然后趋于平稳; 第 4、7、11 号条带在所有样品中均有检出, 且优势度较高均在 4% 以上, 表明这些条带所代表的古菌类群在窖池微生物中可能起着重要作用 (表 1)。

表 1 窖泥古菌 DGGE 图谱的丰度及优势度

Table 1 Abundance and Dominance of DGGE bands of archaea in mud pit of different years

样品	丰度	优势度/%																
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
1	14	0.82	2.43	2.60	10.26	1.44	/	10.76	0.75	/	/	4.33	2.17	/	/	28.73	2.45	4.66
2	17	1.14	4.83	2.34	10.11	1.63	1.43	8.15	5.19	1.27	3.02	11.71	7.98	0.97	1.80	15.02	0.60	8.60
3	16	1.37	3.06	4.62	8.56	4.41	/	13.27	3.53	/	2.92	11.11	4.97	5.53	21.99	/	0.73	1.95

注: “/”为未检出。

2.4 窖泥古菌 DGGE 图谱多样性指数及相似性变化规律

多样性指数是反映群落结构特征的重要指标^[10]。本试验分析了古菌群落 DGGE 图谱多样性指数变化规律, 结果发现: 窖泥古菌多样性指数都在 1.91~2.29

之间, 说明随着窖龄的增加, 古菌在窖池窖泥中变化速度较慢。不同窖龄窖池所表现出的相似度则是 30 年与 100 年达到了 0.61 聚为一类, 但是与 200 年相比较却是分为两类其相似度只有 0.41。这可能是因为窖龄达到 200 年以后其古菌群落结构有了较大程度的改变, 200 年可能是窖池古菌群落的一个分界点 (表 2、图 4)。

2.5 窖泥古菌 DGGE 图谱优势条带切胶回收及鉴定

选取了 5 个优势条带(分别为 30 年 15 号, 100 年 4 号、11 号, 200 年 7 号、14 号)进行切胶回收(图 2)。测序后经 NCBI 进行比对(表 3)。

表 2 窖泥古菌群落相似性指数

Table 2 Similarity of archaea community in mud pit of different years

样品	30 年	100 年	200 年
30 年	100.0		
100 年	61.2	100.0	
200 年	43	55.4	100.0

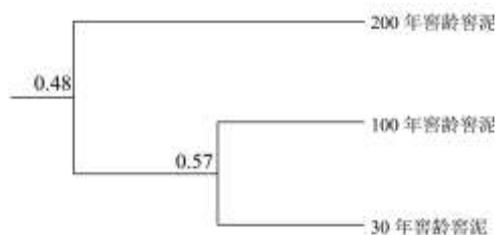


图 4 不同窖龄窖池窖泥古菌群落相似性系数树状图

Fig.4 Dendrogram with Homology Coefficient in put mid at different years

表 3 不同窖龄窖泥 DGGE 条带 16S rDNA 的同源性分析结果

Table 3 BLAST of 16S rDNA sequence of DGGE bands of mud pit of different years

条带	相似菌株	相似性
30 年 15	<i>Uncultured methanogenic archaeon</i> 产甲烷古菌	100%
100 年 4 号	<i>Uncultured Methanoculleus sp.</i> 甲烷袋状菌属	100%
100 年 11 号	<i>Uncultured Methanoculleus sp.</i> 甲烷袋状菌属	99%
200 年 7 号	<i>Uncultured Methanosarcinales archaeon</i> 甲烷八叠球菌属	99%
200 年 14 号	<i>Uncultured rumen archaeon</i> 瘤胃古菌属	99%

2.6 窖泥古菌 DGGE 图谱优势条带系统发育学分析

5 个优势条带在系统发育树上聚为 4 个类群(图 5), 他们分属于产甲烷古菌(产甲烷古菌)、甲烷袋状菌属 (*Methanoculleus sp*)、甲烷八叠球菌属 (*Methanosarcinales archaeon*)、瘤胃古菌属 (*rumen*

archaeon)。

30 年的条带序列与 *Uncultured methanogenic archaeon* 聚为一类, 同源性的为 100%, 能利用 H_2/CO_2 、甲酸、甲醇、甲胺和乙酸, 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, 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。

100 年的两个条带序列与 *Uncultured M.sp.13B* 和 *Uncultured M.sp.DAA-2* 两个相似菌株形成一个族群, 同源性的为 99%, 这两个菌株均能够利用 H_2/CO_2 、异丙醇/ CO_2 、异丁醇/ CO_2 作为底物产生甲烷, 但不能利用乙酸产生甲烷^[11], 是氢营养型产甲烷菌。在白酒生产中, 异丙醇、异丁醇等高级醇也称为杂醇油, 含量过高会使酒具有不愉快的苦味, 因而 *Methanoculleus* 类群对降低原酒杂醇油起到一定作用。

200 年的两个条带序列与 *Uncultured Methanosarcinales archaeon* 和 *Uncultured rumen archaeon* 两个菌株相似, 同源性的为 99%, *Uncultured Methanosarcinales archaeon* 是乙酸营养型产甲烷菌, 常与产乙酸菌互利共生, 形成稳定的丝状结构, 是颗粒活性污泥的重要组成成分^[12-13], *Methanosarcina* 许多菌株晚期会聚集成团, 最后变形裂解, 而优质的老熟窖泥有细腻般的颗粒感, 由此推断, *Methanosarcina* 这种乙酸营养型产甲烷菌在窖泥老熟过程中起了非常关键的作用; 而 *Uncultured rumen archaeon*, 可能是窖泥古菌的一个新种。

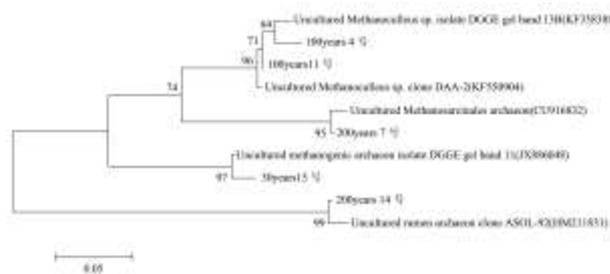


图 5 根据 16S rDNA 序列为基础的窖泥古菌的系统发育树

Fig.5 Phylogenetic tree of the archaeal in mud pit based on 16S rDNA sequence

3 结论

本试验通过 PCR-DGGE 和 16S rDNA 测序技术研究了不同窖龄窖泥古菌的基本构成及多样性变化规律, 揭示了不同窖龄窖泥古菌系统发育多样性的差异。不同窖龄窖泥样品古菌群落 DGGE 条带的丰度值在 13~17 之间, 差异较小; 不同窖龄窖泥的古菌类群有一定的差异, 随着窖龄的增加, 伴随了微生物繁衍交

替,窖泥古菌多样性呈增加趋势,优势菌群的驯化程度越来越高,这可能是由于浓香型白酒生产采用续渣配料工艺,周期性地向窖泥补充有机质和氮、磷、钾等营养元素,加之窖泥中某些细菌不断产生乙酸、 H_2 和 CO_2 ,为窖泥产甲烷菌生长创造了有利条件。对古菌PCR-DGGE图谱上的5个优势条带进行测序,发现其分属于产甲烷古菌(*methanogenic archaeon*)、甲烷袋状菌属(*Methanoculleus sp.*)、甲烷八叠球菌属(*Methanosarcinales archaeon*)、瘤胃古菌属(*rumen archaeon*)四个类群,这说明产甲烷菌群落组成随窖泥微环境变化而体现出多样性,显示出不同的代谢特征和生态功能。

参考文献

- [1] 李大和,黄圣明.浓香型曲酒生产技术[M]北京:轻工业出版社,1991
Li D H, Huang S M. Luzhou-flavor liquor production technology [M]. Beijing: Light Industry Press, 1991
- [2] 张文学,岳元媛,向文良,等.浓香型白酒酒醅中化学物质的变化及其规律性[J].四川大学学报:工程科学版,2005,37(7):44-48
Zhang W X, Yue Y Y, Xiang W L, et al. Changes and Rules of Chemical Composition in the Fermented Grains of Chinese Strong Aromatic Spirits [J], Journal of Sichuan University : Eegineering Science Edition, 2005, 37(7): 44-48
- [3] 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):91-96
Huang Z G, Zhen P, Luo H B. Research on archaea community in Luzhou-flavor liquor pits[J]. Southwest University : Natural Science Edition, 2010, 32 (12): 91-96
- [4] 施思,王海英,张文学,等.浓香型白酒不同窖泥的微生物群落特征分析[J].酿酒科技,2011,5:38-41
Shi S, Wang HY, Zhang WX, et al. Analysis of microbial communities characteristics in different pit mud of Luzhou-flavor liquor [J]. Liquor-Making Science & Technol, 2011, 5: 38-41
- [5] 王明跃,张文学,王海英,等.不同窖龄窖泥古菌的系统发育多样性分析[J].应用与环境生物学报,2012,18(6):1043-1048
Wang MY, Zhang WX, Wang HY, et al. Phylogenetic Diversity Analysis of Archaeal in the Pit Mud with Different Cellar Age [J]. Chin. J. Appl. Environ. Biol., 2012, 18(6): 1043-1048
- [6] 施思,胡承,张文学.一株放线菌产棕色素初探及其16S rDNA序列分析[J].食品工业科技,2010,31(10):239-240
Shi S, Hu C, Zhang WX. Preliminary study on an actinomycete producing brown-pigment and its 16SrDNA sequence analysis [J]. Sci. & Technol. Food Ind., 2010, 31 (10): 239-240
- [7] Alper T Akasubasi, Orhan Ince, Betül Kirdar, et al. Effect of wastewater composition on archaeal population diversity [J]. Water Research, 2005:1576-1584
- [8] ZOETENDAL EG, AKKERMANS ADL, DE VOS WM. 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
- [9] MUYZER G, DE WAAL EC, UITIERLINDEN A G. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16SrRNA [J]. Appl. Environ. Microb., 1993, 59(3): 695-700
- [10] 张薇,胡跃高,黄国和,等.西北黄土高原柠条种植区土壤微生物多样性分析[J].微生物学报,2007,47(5):751-756
Zhang W, Hu YG, Huang GH, et al. Soil microbial diversity of artificial peashrub plantation on North Loess Plateau of China [J]. Acta Microbiol Sinica, 2007, 47 (5): 751-756
- [11] Dianou D, Miyaki T, Asakawa S, et al. Methanoculleus chikugoensis sp. nov., a novel methanogenic archaeon isolated from paddy field soil in Japan, and DNA-DNA hybridization among Methanoculleus species [J]. Int. J. Sys. Evol. Microbiol., 2001, 51: 1663-1669
- [12] Fernández N, Díaz EE, Amils R, et al. Analysis of microbial community during biofilm development in an anaerobic wastewater treatment reactor [J]. Microbiol. Ecol., 2008, 56 (1): 121-132
- [13] 高瑞芳,袁旭峰,王小芬,等.高浓度酒精废水厌氧处理工程系统中古菌多样性及其代谢特征[J].微生物学通报,2011,38(4):468-473
Gao R F, Yuan X F, Wang X F, et al. Archaeal diversity and metabolic function in anaerobic digest process treating high concentration ethanol wastewater [J]. Microbiol China, 2011, 38(4): 468-473