

# 利用非培养技术研究古井贡酒大曲中的细菌群落结构

张会敏<sup>1</sup>, 束莹<sup>1</sup>, 周庆伍<sup>2</sup>, 李安军<sup>2</sup>, 何宏魁<sup>2</sup>, 张治洲<sup>1,2</sup>

(1. 哈尔滨工业大学(威海)海洋科学与技术学院, 山东威海 264209)

(2. 古井贡酒集团股份有限公司, 安徽亳州 236826)

**摘要:** 淡雅型白酒古井贡酒大曲中的微生物群落结构一直未在分子水平上得到解析。本文采用构建 16s rDNA 克隆文库的非培养方法对古井贡酒中温大曲和高温大曲进行细菌群落结构及其多样性研究。所有克隆菌株归为 36 个 OUT, 分别属于厚壁菌门(*Firmicutes*)、变形菌门(*Proteobacteria*)和一些未培养菌类, 其中厚壁菌门占多数。总体来说, 中温大曲明显要比高温大曲细菌多样性更丰富一些。高温大曲的菌种相对比较单一, 绝大多数为高温放线菌 *Thermoactinomyces sanguinis*, 而且仅存在于高温大曲中, 占到高温大曲表面菌群的 79.5%, 高温大曲曲心菌群的 98.5%。中温大曲的两个样本差距比较大。样本 S1 的优势菌为枝芽孢菌属(*Virgibacillus* sp.), 占 85.3%, 另外还有少量的未培养菌类(12.9%)。中温大曲 S2 的细菌多样性比较丰富, 优势菌属为乳杆菌属 *Lactobacillus* (25.2%)、葡萄球菌属 *Staphylococcus* (14.3%)、芽孢杆菌属 *Bacillus* (13.4%) 和各种未培养菌类(16.8%)。古井大曲中存在大量潜在新种, 需要进一步鉴定。

**关键词:** 古井贡酒; 中温大曲; 高温大曲; 细菌群落; TA 克隆

文章编号: 1673-9078(2014)4-44-49

## Analysis of the Microbial Community Structure of Gujingong Liquor Starter through Culture-free Approach

ZHANG Hui-min<sup>1</sup>, SHU Ying<sup>1</sup>, ZHOU Qing-wu<sup>2</sup>, LI An-jun<sup>2</sup>, HE Hong-kui<sup>2</sup>, ZHANG Zhi-zhou<sup>1,2</sup>

(1. School of Marine Science and Technology, Harbin Institute of Technology, Weihai 264209, China)

(2. GuJing Group Co., Ltd., Bozhou 236826, China)

**Abstract:** Molecular analysis of microbial community structure of Gujingong liquor starter has not been reported so far. 16S rDNA clone library technique was conducted to analysis the bacterial community diversity in high-temperature Daqu and medium-temperature starter of GuJingGong liquor. All clone strains were classified to 36 OTUs, belonging to *Firmicutes*, *Proteobacteria* and uncultured bacteria, of which, *Firmicutes* was the majority. Overall, the bacterial diversity of medium-temperature starter was significantly more complex than that of high-temperature starter. *Thermoactinomyces sanguinis* accounted for the main majority of the high-temperature starter strains. Bacterial diversity of the two medium-temperature starter samples was apparently different. Dominant bacteria of the sample S1 belong to *Virgibacillus* sp., accounting for 85.3% in total, in addition to a small amount of uncultured bacteria (12.9%). The dominant bacteria of the sample S2 were *Lactobacillus* (25.2%), *Staphylococcus* (14.3%), *Bacillus* (13.4%) and some uncultured bacteria (16.8%). There are a lot of potential new species that need to be further identified.

**Key words:** Gujingong liquor; medium-temperature starter; high-temperature starter; bacterial community; TA cloning

“曲为酒之骨”，大曲不仅是白酒酿造的糖化发酵剂，其中丰富的生物酶催化生成白酒中各种香味物质。所以，大曲配制过程中应追求大曲中生物酶的多

收稿日期: 2013-08-12

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(31071170); GREDBIO 资金, HIT(hitwh200904); 985 海洋科学资金; HIT-NSRIF (2011101); 威海科技发展项目(2011DXGJ13, 2012DXGJ02)

作者简介: 张会敏(1984-), 女, 博士生, 研究方向: 微生物群落操纵技术  
通讯作者: 张治洲(1967-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 微生物群落操纵技术和纳米生物技术

样性。古井贡酒正是使用春季制的中高温曲和夏季制的高温曲。两种大曲在其培养过程中产生出不同能力作用的复合微生物酶系。因此形成了古井首创的“绵甜净爽香”一香融入味之中, 浓而不烈、香而不艳的白酒新风格。

大曲中的微生物区系、酶系和各种物质在很大程度上决定了白酒的风味、口感及品质。大曲是通过网罗自然界中的各种微生物在其自身上生长而制成的, 大曲中的微生物类群极为丰富, 是多种微生物的混合体系, 主要包括霉菌、细菌和酵母菌。其中, 细菌为

发酵产香的主要动力。古井贡酒大曲的制作以小麦等为主要原料,采用固态生料高温发酵制成,中高温大曲最高品温温度一般控制在 54~60℃,高温大曲制曲温度可以达到 65 度左右。

早期多数采用分离培养鉴定的传统方法研究大曲微生物群落结构<sup>[1]</sup>,对可培养微生物,直到现在仍然是很有效的研究手段<sup>[2-3]</sup>。比如王涛等人<sup>[4]</sup>研究了酒厂中高温大曲和曲房中细菌群落的相关性,发现二者均呈现出一定的多样性,二者的优势菌均为 *Bacillus*,且分别以 *Staphylococcus* 和 *Streptomyces* 为次优势属。但传统培养方法对非培养微生物而言就无能为力了。用分子生物学的方法对大曲中主要菌种进行分子鉴定,是一种快速、简便和有效的方法。分子生物学技术的发展使微生物学研究从可培养技术转向了未培养分析法。胡佳等<sup>[5]</sup>使用 16S rDNA 克隆文库的方法克隆了泸州老窖曲药中的细菌组成,发现高度的细菌多样性。姚粟等<sup>[6]</sup>使用克隆文库的方法研究了芝麻香型白酒高温大曲的细菌群落多样性,得到优势菌属 *Thermoactinomyces*, *Kroppenstedtia*, *Saccharopolyspora*, *Lactobacillus* 和 *Weissella*。赵劲松等人<sup>[7]</sup>使用磷脂脂肪酸生物标记的方法研究了中国浓香型白酒窖泥中的微生物群落结构,结果显示浓香型白酒窖泥中由细菌、放线菌和真菌组成,其中革兰氏阳性细菌和厌氧细菌占主导地位。DengBo 等人<sup>[8]</sup>使用 PCR-DGGE 技

术研究了不同时期窖泥中微生物群落结构变化情况。吕旭聪等人<sup>[9]</sup>同时使用 PCR-DGGE 方法和 16S rRNA 克隆文库的方法研究了武夷红曲糯米酒发酵液中的群落动态变化,发现发酵酒曲中的主要菌种是 *Pediococcus pentosaceus*, *Pediococcus acidilactici* 和 *Bacillus* sp.,而且在不同的发酵阶段比例也不同。他们还同时比较了 PCR-DGGE 方法和克隆文库方法,指出在某种程度上,克隆文库方法更具有代表性。

淡雅型白酒古井贡酒大曲中的微生物群落结构一直未在分子水平上得到解析,而这类研究对逐步深入阐明白酒风味的分子机制、如何深入挖掘白酒的保健价值以及如何在国际范围内进行相关专利保护都是必需的。本研究采用 16S rDNA 克隆文库技术对古井贡酒的中高温大曲和高温大曲中主要细菌的组成比例和进化关系进行了比较详细的分子鉴定。

## 1 材料与方法

### 1.1 古井大曲样品

2012年6月采于古井贡酒股份有限公司四个样品 S1、S2、S3 和 S4。全曲样品取曲块表皮 0~3 cm 部分和中心部分样品进行等量均匀混合,粉碎后密封、-80 度冷藏备用。四个样品有关资料见表 1。

表 1 古井大曲样本资料

Table 1 Gujingong starter samples

基因组样品	种类	取样方式	水份	制备时间	取样时间	色、味
S1	中高温曲	全曲, 储存曲	13.5%	2012 年	2012-06-20	浅黄褐色, 曲香味浓郁纯正, 较干燥
S2	中高温曲	全曲, 生产用曲	11.5%	2012 年	2012-06-20	浅黄褐色, 曲香味浓郁纯正, 较干燥
S3	高温曲	高温大曲表皮 1-2cm	15%	2011 年	2012-06-20	咖啡色, 甜酱味浓郁纯正, 干燥
S4	高温曲	高温大曲曲心	17%	2011 年	2012-06-20	棕褐色, 甜酱味浓郁纯正, 干燥

### 1.2 高温大曲基因组总 DNA 提取

采用北京索莱宝科技有限公司 (Solarbio) 的土壤基因组 DNA 提取试剂盒[编号: D2600]提取样品基因组总 DNA。

### 1.3 细菌 16S rDNA 的 PCR 扩增

扩增引物为 27F (5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG -3') 和 1492R (5'-GGT TAC CTT GTT ACG ACTT-3')。PCR 反应 12 μL 体系: 6 μL 2×NPK02 (GREDBIO) buffer, 1 μL (~50 ng) DNA 模板, 0.8 μL each primer (2 μM), 0.2 μL Taq DNA polymerase (5 U/μL), 4μL dH<sub>2</sub>O。PCR 反应程序: 94℃ 预变性 5 min, 94℃ 1 min, 55℃ 1 min, 72℃ 1 min, 38 个循环,

72℃ 完全延伸 2 min。

### 1.4 细菌 16S rDNA 克隆文库的构建及阳性克隆的筛选

PCR 产物经 1.2% 琼脂糖凝胶电泳, 将位于 1300~1600 bp 左右的条带切胶回收纯化 (上海生工胶回收试剂盒, SK8132)。回收得到的 DNA 片段与载体 pMD19-T 连接进行 TA 克隆 (试剂盒: 大连宝生物, Code: D102A)。连接产物转化大肠杆菌感受态细胞 DH5α (TaKaRa, Code No.9027), 涂布于含氨苄 (100 μg/mL)、X-gal 和 IPTG 的 LB 板上 37℃ 过夜培养, 进行蓝白斑筛选。从 S1、和 S2 随机挑取 120 个克隆,

从 S3 和 S4 随机挑取 80 个克隆, 进行转板备份培养并菌落测序。

### 1.5 克隆测序及序列分析

利用 PCR 引物 27F 和 1492R 进行 DNA 测序(上海生工), 得到双向测序序列。使用 CExpress 软件完成双向序列拼接。拼接所得序列由 EditSeq (Lasergene, DNASTAR, Madison, WI, USA) 软件编辑, 并由 Seqman (Lasergene) 软件去掉来自于 pMD19-T 载体的多余序列。经过编辑完整的序列在 NCBI 的 BLAST 网站进行比对 (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>), 确定与已知序列的同源关系。根据 BLAST 结果, 下载 (<http://www.straininfo.net/>) 24 个标准菌的 16S rDNA 序列, 然后每个 OTU 选用 1 个代表序列, 采用 Mega 5 软件建立 neighbour-joining (Bootstrap method with a 1000 replicates) 系统发育树。

### 1.6 克隆文库评价

用 C 值和稀释曲线对克隆文库的细菌多样性进行分析和评价, C 值代表克隆文库中所包含的微生物的种类占样品中全部微生物种类的比例, 反映了克隆文库对样品群落多样性的代表程度, 数值越大, 代表性越强<sup>[6]</sup>。计算公式为:  $C = (1 - n_1/N) \times 100\%$  计算, N 代表 16S rDNA 克隆文库的库容,  $n_1$  为文库中仅出现过 1 次的 OTU 的数量。稀释曲线 (rarefaction curve) 是通过 aRarefactWin 软件, 用已知的各种 OTU 的相对比例来推算抽取 n 个克隆时出现 OTU 数量的期望值, 然后根据一组 n 值与其相对应的 OTU 数量的期望值所做出的曲线, 当曲线趋于平缓或达到平台期时可以认为库容已经足够。

## 2 结果与讨论

### 2.1 高温大曲基因组总 DNA 提取和 PCR 扩增结果

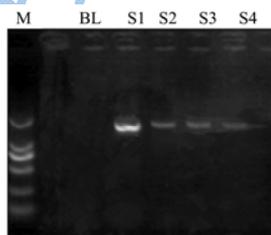


图 1 古井大曲细菌 16S rDNA PCR 产物电泳图

Fig.1 The 16s rDNA PCR products of GuJingGong starter  
首先土壤基因组 DNA 提取试剂盒提取样品基因

组总 DNA。然后, 以样品总 DNA 为模板, 通用引物 27F-1492R 扩增包含 16S rDNA 所有 V 区序列。琼脂糖凝胶电泳显示 PCR 产物单一, 大小约 1500 bp 左右, 见图 1。

### 2.2 细菌 16S rDNA 克隆文库的分析

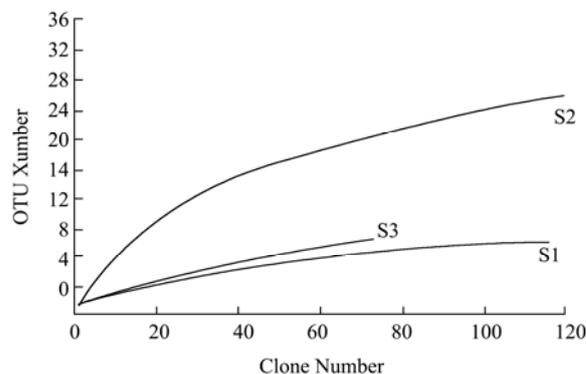


图 2 古井大曲细菌 16S rDNA 克隆文库的稀释曲线  
Fig.2 Dilution curves of 16s rDNA cloning library of GuJingGong starter

从 S1 随机挑取的 120 个克隆中获得 116 个阳性克隆, 归为 10 个 OTU, 16S 克隆文库的 C 值为 98.28%; 从 S2 随机挑取的 120 个克隆中获得 119 个阳性克隆, 归为 30 个 OTU, 16S 克隆文库的 C 值为 89.92% (略低); 从 S3 随机挑取的 80 个克隆中获得 73 个阳性克隆, 归为 10 个 OTU, 16S 克隆文库的 C 值为 90.41%。从 S4 随机挑取的 80 个克隆中获得 67 个阳性克隆, 归为 2 个 OTU, 16S 克隆文库的 C 值为 98.51%。稀释曲线见图 2。由于 S4 只有 2 个 OTU 值, 无法进行稀释曲线的绘制。结合 C 值和稀释曲线可知库容已经满足要求。

### 2.3 细菌群落多样性分析

将各克隆文库的序列通过 NCBI BLAST (Basic Local Alignment Search Tool: <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) 分析得到与 NCBI 数据库中相似度最高的菌种。详细统计信息如表 2 所示。

四个样本文库所得细菌总体归为 36 个 OTU, 这 36 个 OTU 分属于厚壁菌门 (24 个 OTU), 变形菌门 (5 个 OTU) 和各种未培养类细菌组合 (6 个 OTU)。其中, 第 36 个 OTU 为普通小麦基因组, 分析应该来自于大曲制作原料。四个样本的丰度各不一样, 其中样本 S1 有 10 个 OTU, 样本 S2 有 30 个 OTU, 样本 S3 有 10 个 OTU, 样本 S4 只有 2 个 OTU。中温大曲比高温大曲细菌多样性更丰富。高温大曲绝大多数为高温放线菌 *Thermoactinomyces sanguinis*, 占到高温大曲表面菌 (S3) 的 79.5%, 高温大曲曲心菌 (S4) 的

98.5%，而且其只存在于高温大曲中。中温大曲的两个样本差距比较大，样本 S1 的优势菌为枝芽孢菌属 (*Virgibacillus* sp.)，占 85.3%，另外还有少量的未培养菌类 (12.9%)。中温大曲 S2 的第一优势菌属为乳杆菌属 (*Lactobacillus*)，丰度为 25.2%，第二优势菌属为葡萄球菌属 (*Staphylococcus*)，丰度为 14.3%，第四优势菌属为芽孢杆菌属 (*Bacillus*)，丰度为 13.4%。另外，各种未培养菌类也占相当比例 (16.8%)。

代表菌株 (1) -3、(2) -51、(1) -33、2-20、(2) -48、(2) -64、3-62、2-24 与 NCBI 数据库中的序列相似度较低 ( $\leq 94\%$ )，很可能为潜在新种。菌株 (2) -35 的相似度 97%，也可能是潜在新种。

### 2.4 细菌 16S rDNA 系统发育分析

前 35 个细菌 OTU 代表序列的 16S rDNA 系统发育分析结果见图 3。从图上来看，35 个 OUT 分属于两个类群：Firmicutes、Proteobacteria。未培养的各种菌类与标准菌相似性很低，但大都归于两大类中。

代表菌株 (2) -42、(2) -10、2-13、(2) -28、2-3 和 2-74 聚类于 Proteobacteria 系统发育分支。由此可见，Uncultured *Pantoea* 的代表菌株 2-3 属于 Proteobacteria 大类。从图中看，Proteobacteria 系统发育分支上的代表菌株与标准菌之间的序列相似性都很低，比如代表菌株 (2) -42 与标准菌 *Salmonella bongori* ATCC 43975T (AF029227.1) 的相似度只有 81%。该类代表菌株很可能为潜在新种。

其余 29 株代表菌株聚类于 Firmicutes 系统发育分支。由此可见，未培养类代表菌株 2-6、3-62、(2) -52、2-25 和 2-70 属于 Firmicutes 大类。从图中看，Firmicutes

系统发育分支又可细分为很多小的分支。首先，代表菌株 2-20 单独一支，可能为新种。代表菌株 3-38、3-23 聚类 *Thermoactinomyces sanguinis*，其中 3-23 与其标准菌相似度为 100%，3-38 可能为新种。Firmicutes 类其余各菌株又可分为上下两个小分支。上面的小分支又可分为 *Bacillus/Virgibacillus* 和 *Staphylococcus* 两个更小的分支，下面的小分支为 *Weissella/Lactobacillus*。相较于 *Staphylococcus*、*Bacillus* 和 *Virgibacillus* 的亲缘关系更近，而 *Lactobacillus* 与 *Weissella* 的亲缘关系更近。

代表菌株 (1) -33、(2) -43、(2) -37、2-25、2-70、(2) -63、2-41、(1) -3、1-32、2-6 聚类于 *Bacillus/Virgibacillus* 系统发育分支。由此可见，未培养类代表菌株 2-25、2-70、2-6 属于这类。其中，2-41 与其标准菌 *Bacillus licheniformis* BCRC 11702T (EF433410.1) 的相似度为 100%，其余菌株的相似度都很低，均为潜在新种。

代表菌株 3-62、2-69、2-2、2-28、2-30 聚类于 *Staphylococcus* 小分支。由此可见，未培养菌株 3-62 属于这一支。该类代表菌株均为潜在新种。

代表菌株 (2) -51、(2) -52、(2) -64、(3) -38、(2) -20、(2) -21、2-21、2-15、(2) -35、(2) -48、2-8、3-38、3-23 聚类于 *Weissella/Lactobacillus* 分支。未培养类菌株 (2) -52 属于这一分支。代表菌株 (3) -38、(2) -20、(2) -21、2-21、2-15 与其各自的代表菌株的相似度为 100%，代表菌株 (2) -64 与其代表菌株的相似度为 99%，代表菌株 2-8 与其代表菌株的相似度为 96%，其余代表菌株相似度都很低，为潜在新种。

表 2 古井贡酒大曲细菌多样性统计

Table 2 Statistics of Bacteria diversity in GuJingGong Daqusamples

类群	OUT 数目	属	克隆数目				代表菌株	NCBI 数据库中相似度最高的菌种	相似度 /%	
			S1	S2	S3	S4				
Firmicutes	24	<i>Bacillus</i>	1				(1)-3	<i>Bacillus acidicola</i> 105-2(NR_041942.1)	94	
			1	2			(2)-43	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> 10906(JN566073.1)	99	
				1			(2)-51	<i>Bacillus cereus</i> SBZ2-9(HQ236044.1)	94	
				4	1		2-41	<i>Bacillus licheniformis</i> Pb-WC09001(HM006901.1)	99	
				1			(2)-63	<i>Bacillus safensis</i> G1-5-20(KC494307.1)	99	
				2	7		(1)-33	<i>Bacillus</i> sp. LS05 (GU972599.1)	93	
				1			(2)-37	<i>Bacillus subtilis</i> A33 (AB501343.1)	99	
				3			2-69	<i>Staphylococcus kloosii</i> GCA855 (HM209752.1)	100	
				2	3		2-28	<i>Staphylococcus saprophyticus</i> TD2 (HM113469.1)	99	
				2	10	1	2-30	<i>Staphylococcus</i> sp. An21 (AJ551159.1)	99	
					1		2-2	<i>Staphylococcus succinus</i> AT4 (GU084442.1)	99	
				<i>Virgibacillus</i>	91			1-32	<i>Virgibacillus</i> sp. WS 4627 (HE577174.1)	97
				<i>Thermoactinomyces</i>		58	66	3-23	<i>Thermoactinomyces sanguinis</i> (AJ251778.1)	99

转下页

接上页

		Unknown genus*	4	3-38	<i>Thermoactinomyces</i> bacterium JFMB-ATE (FN665656.1)	100			
			2	1	2-15	<i>Lactobacillus brevis</i> KB290(AP012167.1)	100		
			1		2-20	<i>Lactobacillus casei</i> BL23 (FM177140.1)	91		
			5		(2)-35	<i>Lactobacillus fermentum</i> strain: JCM 8581 (AB690170.1)	97		
		<i>Lactobacillus</i>	4	4	(2)-48	<i>Lactobacillus plantarum</i> strain ZJ316 (JN126052.1)	95		
			1		(2)-21	<i>Lactobacillus pontis</i> strain LTH 2587 (NR_036788.1)	99		
			2		2-21	<i>Lactobacillus rossiae</i> strain JL4 (FJ476119.1)	99		
			1		(2)-20	<i>Lactobacillus sanfranciscensis</i> TMW 1.1304 (CP002461.1)	99		
			14		2-8	<i>Lactobacillus</i> sp. T3R2C13 (JX193626.1)	99		
			1		(3)-38	<i>Leuconostoc</i> sp. SAP81.2 (JX067651.1)	99		
		<i>Weissella</i>	2		(2)-64	<i>Weissella cibaria</i> strain: ZU 10 (AB548871.1)	93		
			2	9	2-74	<i>Pantoea agglomerans</i> isolate PSB26 (HQ242739.1)	99		
		<i>Pantoea</i>	1		(2)-10	<i>Pantoea ananatis</i> AJ13355 (AP012032.1)	98		
			1		2-13	<i>Pantoea</i> sp. GJT-8 (FJ426593.1)	99		
			1		(2)-28	<i>Pantoea vagans</i> C9-1 (NR_102966.1)	99		
		<i>Salmonella</i>	1		(2)-42	<i>Salmonella bongori</i> strain 10A (KC329819.1)	99		
		Uncultured <i>Bacillus</i>	2	7	1	2-6	Uncultured <i>Bacillus</i> sp. clone JPL-4 (FJ957796.1)	99	
		Uncultured <i>Staphylococcus</i>			1	3-62	Uncultured <i>Staphylococcus</i> sp. clone JPL-4_C03 (FJ957785.1)	94	
		Uncultured <i>Lactobacillaceae</i>	3		(2)-52	Uncultured <i>Lactobacillaceae</i> bacterium clone PC-C65(JQ809314.1)	99		
		Uncultured <i>Pantoea</i>	1	6		2-3	Uncultured <i>Pantoea</i> sp. clone ASC12 (JF357619.1)	98	
		Uncultured soil	1			2-25	Uncultured soil bacterium clone TE6 (DQ248282.1)	92	
		Uncultured	12	20	1	1	2-70	Uncultured bacterium clone AKIW668 (DQ129420.1)	98
		<i>Triticum aestivum</i>	1			2-55	<i>Triticum aestivum</i> mitochondrion (GU985444.1)	99	
	总计		36	116	119	73	67		

Note: Unknown genus\*-This strain belongs to *Thermoactinomyces* (*Bacillales*, *Bacilli*, *Firmicutes*), but its genus name was uncertain.

### 3 结论

3.1 相对于传统微生物分析手段,利用非培养方法分析古井大曲细菌的群落结构,可发现常规培养方法难以发现的微生物类群,比如表2中所展示的未培养的各类细菌。本研究首次采用16S rDNA克隆文库技术对古井大曲的细菌区系进行分析。其中,*Thermoactinomyces sanguinis* 被发现为古井高温大曲的优势菌,只存在于高温大曲中,在高温大曲曲心中集中存在。这与高亦豹等人<sup>[10]</sup>在中国白酒高温和中温大曲的细菌群落分析结果一致。中温大曲优势菌属为枝芽孢菌属 (*Virgibacillus* sp.), 乳杆菌属 (*Lactobacillus*), 葡萄球菌属 (*Staphylococcus*), 芽孢杆菌属 (*Bacillus*) 等类群,其中发现了相当量的未

培养菌类。不过,在古井中文大曲中未发现高亦豹等人报道的在大曲中普遍存在的 *Lactobacillus helveticus* 和 *Lactobacillus panis* 这两种乳杆菌。

3.2 通过16S rDNA系统发育分析,发现古井大曲中存在相当量的潜在新种。

3.3 本研究着重使用16S rDNA克隆文库技术分析古井大曲的细菌多样性,相对于传统培养分析方法获得了更为丰富的细菌种类信息。但是高温制曲是一个动态变化的过程,随着发酵过程中环境温度和湿度的变化,微生物的群落结构不断发生变化,如果能够使用DNA文库技术、PCR-DGGE、焦磷酸测序技术等基因指纹图谱技术实现动态分析古井大曲发酵过程中微生物的演替变化,并结合传统的分离、培养、鉴定、功能性分析微生物技术,全面系统的揭示古井制曲过程

中微生物群落的变化规律, 将会为古井贡酒的质量检测、维护和工艺优化提供理论依据。或者如果能实现只对微生物群落的 16S rDNA 信息准确识别并定量, 那么将会省去繁琐的常规菌种鉴定, 实现快速检测跟踪大曲制备及生产工艺过程的目的。

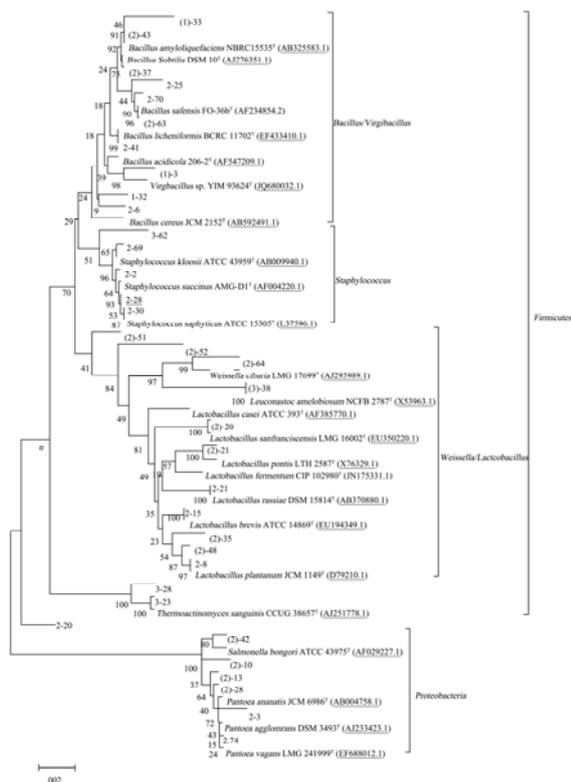


图3 根据 16S rDNA 序列构建的系统发育树。使用了 35 个代表性 OTU 序列和 24 个标准菌序列。

**Fig.3 Construction of phylogenetic tree based on 16S rDNA DNA sequences using 35 representative OTU sequences and 24 standard bacteria sequences.**

参考文献

[1] 刑钢,敖宗华,邓波.大曲中微生物研究和检测进展[J].酿酒科技,2012,12:86-89  
XING Gang, AO Zonghua, DENG Bo. Research & Detection Progress of Microbes in Daqu [J]. Liquor Making Science and Technology, 2012, 12: 86-89

[2] Changlu Wang, Dongjian Shi, Guoli Gong. Microorganisms in Daqu: a starter culture of Chinese Maotai-flavor liquor [J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2008, 24(10): 2183-2190

[3] Xiaowei Zheng, Mino Rezaei Tabrizi, M J Robert NOTU, et

al. DaQu-A traditional Chinese liquor fermentation starter [J]. Journal of the Institute of Brewing, 2011, 117(1): 82-90

[4] 王涛,游玲,赵东,等.中高温大曲和曲房细菌群落的相关性[J].食品与发酵工业,2012,38(1):8-14  
WANG Tao, YOU Ling, ZHAO Dong, et al. Correlation Between Bacterial Community of High-temperature DaQu and Air of Qu Workshop [J]. Food and Fermentation Industries, 2012, 38(1): 8-14

[5] 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  
HU Jia, DENG Bin, ZHANG Wenxue, et al. Constitution and systematic analysis of bacterial community in Daqu samples of strong aromatic chinese spirits [J]. Liquor Making Science and Technology, 2007, 5: 17-19

[6] 姚粟,葛媛媛,李辉,等.利用非培养技术研究芝麻香型白酒高温大曲的细菌群落多样性[J].食品与发酵工业, 2012, 38(6):1-6  
YAO Su, GE Yuanyuan, LI Hui, et al. Analysis on bacterial communities in high temperature Daqu of sesame flavor liquor through culture-free approach [J]. Food and Fermentation Industries, 2012, 38(6): 1-6

[7] Jinsong Zhao, Jia Zheng, Rongqing Zhou, et al. Microbial community structure of pit mud in a Chinese strong aromatic liquor fermentation pit [J]. Journal of the Institute of Brewing, 2012, 118: 356-360

[8] Bo Deng, Caihong Shen, Xiaohu Shan, et al. PCR-DGGE analysis on microbial communities in pit mud of cellars used for different periods of time [J]. Journal of the Institute of Brewing, 2012, 118: 120-126

[9] Xucong Lv, Ruolan Huang, Fang Chen, et al. Bacterial community dynamics during the traditional brewing of Wuyi Hong Qu glutinous rice wine as determined by culture-independent methods [J]. Food Control, 2013, 34: 300-306

[10] 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].微生物学报,2010,37(7):999-1004  
GAO Yibao, WANG Haiyan, XU yan. Microbiology China. PCR-DGGE analysis of the bacterial community of Chinese liquor high and medium temperature Daqu [J]. Microbiology China, 2010, 37(7):999-1004