

浓香型大曲原核微生物群落的 PCR-SSCP 解析

罗惠波* 黄治国 李浩 张强 卫春会

(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: 采用 PCR-SSCP(单链构象多态性)技术对浓香型大曲发酵过程中原核微生物群落结构的变化情况进行了研究, 结果表明: (1)发酵各时期曲样的群落结构相似, 同时也具有多态性; (2)不同微生物群落具有协同和制约的复杂生态学效应; (3)各时期曲样微生物多样性指数均在 1.69~2.01 之间, 群落结构相对较稳定; (4)各曲样微生物群落相似性位于 0.67~1.00 之间, 邻近时期样品间的相似性程度较高。

关键词: 大曲, PCR-SSCP, 16S rDNA, 微生物群落

PCR-SSCP Analysis of the Pronucleus Microbial Communities in Luzhou-flavor Daqu

LUO Hui-Bo* HUANG Zhi-Guo LI Hao ZHANG Qiang WEI Chun-Hui

(Liquor-making Biotechnology & Application Key Laboratory of Sichuan Province, Sichuan University of Science & Engineering, Zigong, Sichuan 643000, China)

Abstract: PCR-SSCP (single-strand conformation polymorphism) was used for studying the community changes of pronucleus microorganisms in various fermenting stages of Luzhou-flavor Daqu. The results showed: (1) The pronucleus microorganism's community was similar and also had the polymorphism in each sample of various fermentation stage; (2) Different microflora had complex ecology effects of coordination and the restriction; (3) The diversity indexes of different stage of Daqu microorganisms were around 1.69~2.01, and the composition of them was stable relatively; (4) The similarity indexes were 0.67~1.00, and much higher in the approaching stages.

Keywords: Daqu, PCR-SSCP, 16S rDNA, Microflora

大曲作为白酒生产中微生物及酶的主要来源, 其质量直接关系到酒的出酒率及酒质。大曲的生产过程是环境中的微生物在大曲中富集和筛选的过程, 故大曲的质量与大曲中微生物群落的代谢有直接联系。微生物的代谢过程是形成白酒骨架成分和痕量风味成分的重要因素。因此研究大曲中微生物区系的构成及变化, 对于研究中国白酒风味因子的形成

机理、有效地控制环境条件和实现名优白酒生产的异地再现, 具有积极的指导意义。大曲微生物群落所涉及的微生物种类众多繁杂。前人利用微生物常规分离鉴定方法, 对中国浓香型大曲微生物区系的构成作了一些探索性研究^[1], 取得了一定成果。但常规的分离培养不但费时费力, 而且绝大多数微生物不能或很难培养。据统计, 通常环境中可培养的微

生物不到微生物总数的 1%^[2]。基因指纹技术(Genetic fingerprinting)是近年来随着分子生物学的发展而迅速崛起的用于分析微生物群落的结构、动态等特征的技术,不需要对微生物进行培养,以群落总 DNA 为模板,通过 PCR 扩增不同种属中的目标基因,再以特定技术将代表不同类群微生物的 PCR 产物以独特的带型、波峰等图谱的形式展现出来。其在特殊微生态环境中微生物群落分析中已经有了广泛的应用^[3],本研究利用 PCR-SSCP 技术研究了浓香型大曲发酵过程中优势原核微生物群落结构的变化规律,通过对大曲优势原核微生物群落的构成及变化规律的分析,可望对大曲生产工艺的改进提供理论支撑。

1 材料与方法

1.1 试验材料

泸州老窖“久香”牌包包曲。在发酵第 1 天、第 3 天、第 5 天、第 7 天、第 9 天、第 20 天、第 40 天采取同一批次大曲样品。采样后立即冷藏,尽快分析。

引物由上海英俊生物技术公司合成, *Taq* DNA polymerase、dNTPs、TaKaRa Ex *Taq*(DRR101AM)、TaKaRa *Taq*(DRR100AM)、DNA Marker DL2000 购自宝生物工程(大连)有限公司, E.Z.N.A.TM Soil DNA Kit 试剂盒购自美国 Omega 公司。

1.2 大曲微生物总 DNA 的提取

取整块大曲粉碎、混匀,使用 Omega 公司 E.Z.N.A.TM Soil DNA Kit 试剂盒提取大曲微生物总 DNA。

1.3 PCR 反应

选用原核微生物通用引物 8f 和 519r 扩增 16S rDNA 基因 V1~V3 高变区^[4]。引物 8f (对应 *E. coli* 16S rRNA 的 8 到 27)的序列: 5'-AGAGTTTGATCC TGGCTCAG-3', 引物 519r (对应 *E. coli* 16S rRNA 的 519 到 533)的序列: 5'-GTATTACCGCGGCTGCT GG-3'。PCR 反应体系为 50 μ L, 分别包括: 0.5 μ L *Taq* 酶(5 U/ μ L), 5.0 μ L 10 \times buffer, 3.0 μ L MgCl₂ (25 mmol/L), 2.0 μ L dNTPs mixture(各 2.5 mmol/L), 引物(10 μ mol/L)各 1.5 μ L, 5.0 μ L 模板 DNA (100 ng/ μ L), 31.5 μ L 灭菌双蒸水。PCR 扩增程序: 94 $^{\circ}$ C 5 min; 94 $^{\circ}$ C 1 min, 60 $^{\circ}$ C 1 min, 72 $^{\circ}$ C 3 min, 30 个循环; 最后 72 $^{\circ}$ C 8 min。

1.4 SSCP 分析

对 PCR 产物进行 SSCP 分析: (1) 在 10 μ L PCR 产物中加入 10 μ L 变性缓冲液(95%甲酰胺, 0.03%二甲苯青, 0.05%溴酚蓝, EDTA 20 mmol/L), 煮沸变性 10 min 后, 立即置冰水中放置 10 min, 然后加样。(2) 将变性后的样品点样于浓度为 8%的非变性聚丙烯酰胺凝胶中(交联度为 49:1, 不加甘油), 电泳缓冲液为 0.5 \times TBE, 在 4 $^{\circ}$ C 下 200 V 下恒压电泳 15 h, 银染后拍照。

1.5 多样性指数分析

研究微生物群落多样性的方法很多, 本文主要用丰度(S)、优势度、样品间相似性指数(C_s)和 Shannon-wiener 指数(H)来表示。所得图像通过 BIO-1D 软件分析, 将 SSCP 图谱转变为波峰图, 每个波峰代表 1 个条带, 即 1 个种, 峰下面积代表该条带的亮度, 即相对数量^[5]。具体过程如下:

(1) 丰度(S): 用 SSCP 图谱中条带的个数来表示。

(2) 优势度: 用某一特定条带的峰面积占样品总体峰面积的百分数来表示。

(3) Shannon-wiener 多样性指数^[6]: 反映群落种类与均匀度的混合参数, 即原核微生物种类数目多, 可增加多样性; 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 越大, 表示该系统中的生物多样性越高。它可以消除不同群体间, 样本容量大小对多样性指数的影响, 受群落物种丰富度的影响较大。

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

式中, H 为 Shannon-wiener 多样性指标值; p_i 为第 i 个物种所占的百分比, 即是第 i 种的个体数与个体总数的比例; S 为样品中含有多少种不同的物种的数量, 即该样品总 SSCP 条带数。

(4) 相似性用索伦森配对相似性系数(Sorenson pairwise similarity coefficient)^[7]来计算:

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

式中, C_s 为索伦森配对相似性系数; a 为某一样品的 PCR-SSCP 图谱的条带数目; b 为另一样品的 PCR-SSCP 图谱的条带数目; j 为两个泳道所共有条带的数目。完全不同的两个图谱其 Sorenson 指数为 0, 而完全相同的两个 DNA 图谱的 Sorenson 指数是 100%。运用 Bio-1D 软件对 SSCP 指纹图谱的相

似性数据进行计算。

2 试验结果及分析

2.1 16S rDNA 的 PCR 扩增产物

浓香型大曲发酵过程 7 个阶段样品中微生物总 DNA 经原核微生物 16S rDNA PCR 扩增后均产生一条 550 bp 左右的 DNA 片段(图 1)。

2.2 16S rDNA PCR-SSCP 图谱

从原核微生物 SSCP 电泳图谱(图 2)中可以看出, 每个泳道均出现 6~8 条比较清晰的条带, 说明样品

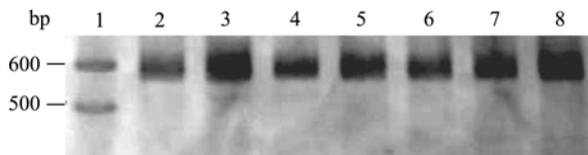


图 1 原核微生物 16S rDNA PCR 扩增结果

Fig. 1 PCR products of 16S rDNA fragment of pronucleus microbes

Note: 1: DNA marker DL2000; 2~8: Fermenting for 1 d, 3 d, 5 d, 7 d, 9 d, 20 d and 40 d.

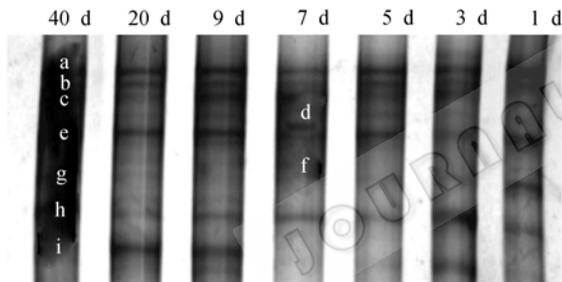


图 2 浓香型大曲原核微生物 SSCP 分析结果

Fig. 2 Results of SSCP of pronucleus microbes in Daqu samples

的 16S rDNA PCR 产物通过 SSCP 得到了很好的分离。不同样品的电泳图谱, 主要条带的位置大致相同, 表明了各个时期样品的菌群结构相似的事实, 它们是浓香型大曲发酵过程中的主要优势菌群, 同时部分条带并不在所有泳道中存在, 表明了各个时期样品的菌群也具有多态性。条带的明亮程度与条带中 DNA 的含量及大曲中该种群的数量成正比, 同一位置处条带越亮, 表明样品中这类菌群的数量越多。

2.2.1 浓香型大曲原核微生物 16S rDNA PCR-SSCP 图谱的优势度分析: 本试验对浓香型大曲原核微生物 16S rDNA PCR-SSCP 图谱的优势度进行分析, 结果发现: 在不同样品中位于同一位置处的条带的优势度值不相同, 且每一条带的优势度值随取样时间的推移均发生不同程度的变化(表 1)。分别位于同一位置处的 a、b、c、e 和 h 条带为各个样品中的主体条带, 其中位于相同位置处的 h 条带在各个样品中的优势度值均达到最大, 表明它所代表的种群始终为整个大曲发酵过程中最优势的种群, 优势度值最高可达 25.4%。b 条带在各个样品中的优势度值普遍偏少, 说明它所代表的种群数量在发酵过程中的优势种群中最少, 优势度最低值为 4.9%。f 条带只在第 7 天检测到, 优势度较小, 对发酵过程影响不大。d、g、i 条带在某些样品中未检测到, 这可能是某些特定种群的数量增长导致代谢产物的增加, 在某一环节上阻碍或改变了这种菌群的代谢途径, 导致了这种菌群生长代谢繁殖的停滞, 或者是发酵条件发生较大改变, 这些种群由于不适宜环境数量减少。

表 1 浓香型大曲原核微生物 SSCP 条带的丰度及优势度结果

Table 1 Abundance ratio and degree of dominance about SSCP bands of pronucleus microbes in Daqu samples

指标 Index		1 d	3 d	5 d	7 d	9 d	20 d	40 d
丰度(S) Abundance (S)	条带 Band	6	8	8	8	6	6	7
	a	15.6	11	12.9	12.6	14.7	15.2	14.4
	b	6.4	4.9	7	5.5	7.1	7.8	5.6
	c	—	8.5	7	11.4	9.8	9.1	10.4
优势度(%) Dominance (%)	d	14.4	6.4	8.1	7.5	—	—	—
	e	15.6	17	14	15.4	17.9	18.2	16
	f	—	—	—	15	—	—	—
	g	19.6	12.7	14.8	10.6	—	—	13.2
	h	28.4	22.3	23.6	22	25.4	18.2	22.4
	i	—	17.3	12.5	—	25	31.6	18

浓香型大曲发酵过程中各条带的优势度值呈“波浪形”变化(图3),说明各条带所对应的种群数量在大曲生产过程中存在演替现象。a、b条带优势度变化趋势比较相似,且都比较平缓,有表现的协同现象;a、c条带优势度变化趋势相悖,有表现的制约现象;而c、e条带在第7天前有表现的协同现象,在第7天后有表现的制约现象,这可能是由于在发酵过程中,某种发酵条件或其他菌群对他们的影响,使这两个条带所代表的菌群数量缓慢增长,外部表现出共生的关系,当这种条件改变时,两种菌群改变生长状态,相互之间出现制约的关系。

从发酵的进程上看,在发酵初期(1 d~3 d),原核微生物优势度变化很大,c条带出现,说明在发酵初期,原核微生物菌群数量发生明显的变化,群落结构发生改变。在主发酵期(3 d~9 d),除b、c条带外,其余比较平缓,变化率最高为23%,而b、c条带最高变化率为63%。在发酵末期(20 d以后),除h条带外各条带变化平缓,种群结构相对稳定。发酵末期a、c条带数值变化已趋于稳定,b、e、h条带变化相对明显,说明种群数量在发酵末期仍有一定程度的变化。对主体条带之间优势度的变化规律的比较,可在一定程度上反映出优势菌群之间的种群关系,最终可指导大曲的生产工艺。

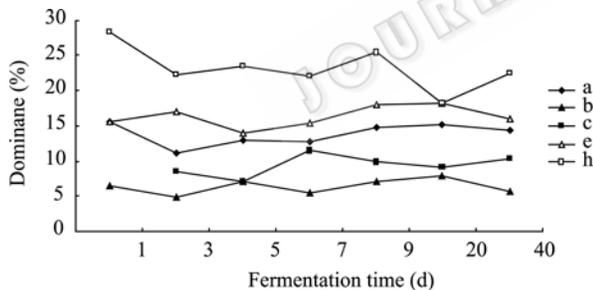


图3 大曲样品中不同位置条带随时间的变化

Fig. 3 The changes of different position SSCP bands with time in Daqu samples

2.2.2 16S rDNA PCR-SSCP 图谱的多样性指数:在 Shannon-wiener 多样性指数(H 值)中包含2个因素: 种类数目,即丰富度; 种类中个体分配上的平均性(Equitability)或均匀性(Evenness)^[8]。原核微生物种类数目多,可增加多样性;同样,种类之间个体分配均匀性的增加也会使多样性提高。 H 越大,表示生物多样性越高。

本试验分析了浓香型大曲原核微生物 16S rDNA PCR-SSCP 图谱的生物多样性指数,结果发现:

7个曲样的原核微生物多样性指数在1.69~2.01之间变化(图4),变化幅度较小,说明在大曲发酵过程原核微生物种群结构相对较稳定。第3天到第7天曲样的 H 值较高且变化较小,表明此时期原核微生物群落丰富且相对稳定,第1天、第9天、第20天曲样的 H 值明显低于其他时期,表明这几个时期的原核微生物群落多样性明显低于其他时期。在大曲发酵温度较高的第3天到第7天, H 值不但没有降低反而有升高的趋势,说明温度对原核微生物多样性的影响较小^[9]。到第9天、第20天原核微生物多样性降低可能与湿度或者水分有关,也有可能是某些原核微生物种群受抑制,到第40天 H 值升高,可能是抑制解除,原核微生物多样性增加。总之,具体分析某个时间点的原核微生物群落多样性,对大曲生产工艺的改良,如大曲生产中对发酵温度和时间的控制等有提供一定的理论指导意义。

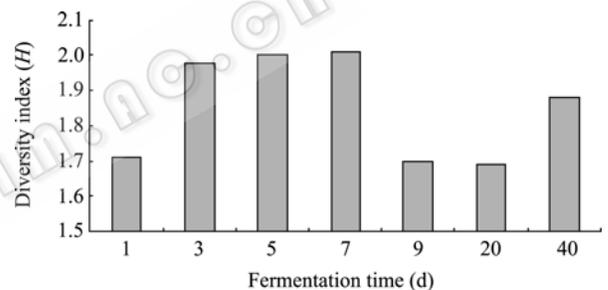


图4 不同大曲微生物的 Shannon-wiener 多样性指数变化

Fig. 4 Shannon-wiener diversity index of different Daqu microbes

2.2.3 16S rDNA PCR-SSCP 图谱的相似性指数:

本试验分析了浓香型大曲原核微生物 16S rDNA PCR-SSCP 图谱的相似性指数,结果发现:不同发酵时期大曲的原核微生物群落相似性各不相同,但都位于0.67~1.00之间(表2),随着时间的推移,邻近时期样品间的 C_s 值变化率最高为0.19,最低为0,说明相临时期样品间的相似性程度较高。第3天 SSCP 指纹图谱和第5天 SSCP 指纹图谱的相似性达100%,说明第3天和第5天两个样品的 SSCP 图谱完全相同。随着时间的推移,与第40天样品的 SSCP 图谱相比,第3~5天阶段 C_s 值由0.77升高到0.93,说明菌落多样性在一定程度上有所升高;发酵达到第7天 C_s 值下降至0.67,原核微生物种群结构发生较大变化,原核微生物群落可能经过某种条件的筛选;到第9天以后 C_s 值分别为0.92、0.92,表明微

表 2 浓香型大曲各取样点样品间的 C_s 值
Table 2 C_s values of different Daqu samples

Fermentation time (d)	1	3	5	7	9	20	40
1	1.00						
3	0.86	1.00					
5	0.86	1.00	1.00				
7	0.86	0.88	0.88	1.00			
9	0.67	0.71	0.86	0.71	1.00		
20	0.67	0.71	0.86	0.71	1.00	1.00	
40	0.77	0.93	0.93	0.67	0.92	0.92	1.00

生物群落结构越来越相似, 此时的微生物群落结构基本稳定。

3 讨论

微生物在大曲生产过程中起着关键作用, 然而大曲发酵过程中微生物群落的作用和生态学特性却一直没有得到深入的研究, 这也制约了白酒行业的发展。利用 SSCP 法对浓香型大曲不同发酵时间样品中的原核微生物多样性进行研究, 可以得到相对直观的菌群动态变化规律, 为进一步揭示白酒发酵的机理提供基础资料。

利用 SSCP 技术可以发现一些在传统培养技术中没有分离得到的原核微生物种群, 赵阳国、任南琪、王爱杰等, 分析完全混合式硫酸盐还原反应器中微生物的群落结构, 共得到 13 条可辨晰的 SSCP 条带^[10], 在本文中每个泳道均出现 6~8 条比较清晰的条带, 这要比传统培养得到的原核微生物类别要少的多, 这是因为每一条 SSCP 谱带中可能同时含有很多类不同的菌群。这个问题是以基因指纹技术为基础的群落分析方法无法避免的, 这一弱点可以通过大量的克隆测序加以克服^[10]。

在对 SSCP 图谱的优势度分析中, 发现在各个样品 SSCP 图谱中, e、h 条带相对于其他条带而言, 优势度和变化程度均较大, 说明在大曲发酵过程中, 这两个条带所代表的原核微生物菌群为相对优势的菌群, 可能在发酵过程中起主要的作用。因此在大曲发酵过程中, 对这两个菌群的研究显得尤为重要。此外, SSCP 图谱中条带优势度的变化情况能发酵过程中菌群数量的变化情况, 进而在一定程度上反映这两个群落之间的相互关系。

4 小结

浓香型大曲的发酵过程是一个复杂的生物学过程, 不同微生物群落间具有协同和制约的复杂生态

学效应, 且与外界因素相互影响, 产生一定的协调作用。大曲发酵过程中温度的变化, 对原核微生物多样性的影响较小, 发酵后期原核微生物多样性的改变可能是受湿度、水分的影响。PCR-SSCP 技术在评价微生物群落结构的变化上有直观、方便和快捷的优点, 用于研究原核微生物群落变化情况, 将对今后大曲生产工艺的进步有很大的帮助。但 SSCP 图谱与群落实际结构符合程度有待提高, 这主要是由基因组 DNA 提取方法和 PCR 选择性放大造成的偏差^[11]。用现代分子生物学技术结合传统的培养纯化法在分析复杂的微生物群落结构时可能结果更为准确。在本文的后续研究中将对 SSCP 图谱中出现的条带进行测序, 以期更客观的反应样品中微生物群落结构的特征。

参 考 文 献

- [1] 张文学, 乔宗伟, 向文良, 等. 中国浓香型白酒窖池微生物生态研究进展. 酿酒, 2004, 31(2): 31-35.
- [2] Yen RWC, Vertion PM, Nelkin BD, et al. Nucleic Acids Res. 1992, 20(9): 2287-2291.
- [3] 张洪勋, 晓 谊, 齐鸿雁. 微生物生态学研究进展. 生态学报, 2003, 23(5): 988-995.
- [4] Coates JD, Ellis DJ, Elizabeth L. Recovery of humic-reducing bacteria from a diversity of environments. *Appl Environ Microbiol*, 1998, 64: 1504-1509.
- [5] 米文秀, 谢 冰, 徐亚同. PCR-SSCP 技术用于脱臭微生物群落结构的研究. 环境科学, 2008, 28(7): 1993-1997.
- [6] Gillan DC, Speksnijder AG, Zwart G. Genetic diversity of the biofilm covering *Montacuta ferruginosa* (Mollusca, Bivalvia) as evaluated by denaturing gradient gel electrophoresis analysis and cloning of PCR amplified gene fragment coding for 16S rDNA. *Applied and Environmental Microbiology*, 1998, 64: 3464-3472.
- [7] 高平平, 赵立平. 微生物群落结构探针杂交评价不同培养基从活性污泥分离优势菌群的能力. 微生物学报, 2003, 43(2): 264-270.
- [8] 魏 薇. 利用 DGGE 技术研究黑龙江省各地沤麻系统中细菌多样性. 黑龙江大学硕士学位论文, 2007.
- [9] 李 浩. 浓香型大曲微生物微生物群落多样性研究. 四川理工学院硕士学位论文, 2009.
- [10] 赵阳国, 任南琪, 王爱杰, 等. SSCP 技术解析硫酸盐还原反应器中微生物群落结构. 环境科学, 2005, 26(4): 172-176.
- [11] 刘小琳, 刘文君. 生物陶粒与生物活性炭上微生物群落结构的 PCR-SSCP 技术解析. 环境科学, 2007, 28(4): 924-928.