

文章编号:1673-1689(2009)01-0102-05

大曲中酵母菌种群结构及多样性分析

惠丰立, 柯涛, 褚学英, 张彩莹, 陶爱丽

(南阳师范学院 生命科学与技术学院, 河南 南阳 473061)

摘要: 将传统培养方法与分子生物学技术相结合, 对大曲中酵母菌种群结构特征及多样性进行研究。从大曲中共获得 92 株酵母菌纯培养, 通过 5.8S-ITS RFLP 指纹图谱分析后, 得到 12 个不同的类群。从各个类群中随机选取代表菌株进行 26S rDNA D1/D2 区域序列分析和系统发育分析, 大曲中酵母菌主要分布在 *Saccharomyces*、*Pichia*、*Zygosaccharomyces*、*Debaryomyces*、*Candida*、*Endomyces*、*Rhodotorula*、*Hanseniaspora*、*Issatchenkia* 9 个已知酵母菌属。传统培养方法与分子生物学技术相结合能较好地揭示大曲中酵母菌的种群结构及多样性。

关键词: 大曲; 酵母菌; 5.8S-ITS 限制片段长度多态性; 26S rDNA D1/D2 区域; 多样性

中图分类号: Q 93

文献标识码: A

Analysis on Community Composition and Diversity of Yeast Isolated from Daqu

HUI Feng-li, KE Tao, CHU Xue-ying, ZHANG Cai-ying, TAO Ai-li
(College of Life Science and Technology, Nanyang Normal University, Nanyang 473061, China)

Abstract: In this manuscript, the community composition and the diversity of yeast what isolated from Daqu were examined by the combination of traditional culture and molecular biology. By analysis of the restriction patterns of amplified 5.8S-ITS rDNA with the enzyme *Hinf*I and *Hae* III, respectively, the isolates were clustered into 12 genotypes, and the representatives of each genotype were randomly chosen for the determination of 26S rDNA D1/D2 domain sequence. The phylogenetic analysis revealed that all of the isolates belonged to 9 generas: *Saccharomyces*, *Pichia*, *Zygosaccharomyces*, *Debaryomyces*, *Candida*, *Endomyces*, *Rhodotorula*, *Hanseniaspora* and *Issatchenkia*. The results showed that the combination method were efficient in generating more accurate information on community composition and diversity of yeast isolated from Daqu.

Key words: Daqu; yeast; 5.8S-ITS RFLP; 26S rDNA D1/D2 domain; diversity

白酒是我国传统的发酵食品, 具有悠久的历史
和深厚的酒文化内涵, 以其独特风格深受消费者厚

爱。大曲是白酒生产的动力, 在酿造过程中起着重
要的糖化、发酵、生香的作用, 直接或间接影响白酒

收稿日期: 2007-12-12

基金项目: 河南省自然科学基金项目 (0411032300)。

作者简介: 惠丰立 (1965-), 男, 河南南阳人, 理学硕士, 教授, 主要从事微生物资源与分子生态学研究。

Email: huifl@126.com

的产量、质量和风格^[1-2]。众所周知,大曲生产是传统工艺,自然培菌,网络和富积环境中的微生物,微生物区系十分复杂。酵母菌是大曲主要的功能微生物之一,它主要有酒精酵母和产酯酵母等,其中酒精酵母是大曲中主要的产酒功能菌,产酯酵母可产多种醇、醛、酯等芳香物质^[2]。因此,揭示大曲中酵母菌的数量和组成对提高大曲质量及进一步搞清大曲与白酒质量的因果关系有重要意义。

由于地域政治、传统文化、经济发展等诸多因素,国外学者对中国大曲的认识近乎空白。国内学者对大曲的研究起步较早,研究得也较深入,但研究工作更多的是对传统工艺的改良与更新,而对大曲中酵母菌种群结构及多样性的研究相对较少。施安辉等研究了徐坊大曲中酵母菌数量,并对分离的优势酵母菌进行了鉴定^[3]。姚万春等对泸州老窖固窖大曲不同层次间酵母菌数量、种类和优势种群差异及规律进行了初步研究^[1]。目前对大曲中酵母菌种群多样性的研究,基本上是依赖传统的形态和生理生化特征的分类和鉴定^[3],需要进行一系列复杂形态和生理生化试验。这种方法最大的缺点是,即使使用最复杂的试验组合也不能对分离物进行精确鉴定,不能反映分离物的系统发育关系,不能获得微生物多样性的真正概貌。近年来,随着分子生物学技术的发展,5.8S-ITS RFLP及26S rDNA D1/D2区域序列分析被愈来愈多地应用于酵母菌的分子分类学、分子系统和多样性研究中^[4-8]。Esteve-Zarzoso等将5.8S-ITS RFLP指纹技术应用于食品和发酵饮料中酵母菌的分类和鉴定,建立了由132种酵母菌5.8S-ITS RFLP指纹图谱组成的数据库^[4]。Kurtzman等和Fell等研究绝大部分子囊菌酵母和担子菌酵母26S rDNA D1/D2区域序列,发现用这段序列,可以将绝大部分种区别开,而种内菌株间的碱基差异不大于1%^[6-8]。由于这些序列均已公布于GenBank/EMBL/DBJ等国际核酸数据库,为酵母菌的分子分类学和分子系统研究带来很大便利。作者采用传统培养方法与分子生物学技术相结合的方法,揭示大曲中酵母菌种群结构特征,为进一步搞清大曲与白酒质量的因果关系奠定基础。

1 材料与方 法

1.1 材料与试剂

1.1.1 样品及处理 中温大曲由河南天冠企业集团卧龙酒厂提供;试验前将大曲外、中、内3层的混合曲样在无菌条件下粉碎。

1.1.2 培养基

1) 麦芽汁培养基:12 Bx 麦芽汁,去氧胆酸钠 0.05 g/dL,氯霉素 0.05 g/dL,琼脂 1.5 g/dL。

2) 马铃薯葡萄糖培养基:马铃薯 20 g/dL,葡萄糖 2 g/dL,去氧胆酸钠 0.05 g/dL,氯霉素 0.05 g/dL,琼脂 1.5 g/dL。

1.1.3 试剂与试剂盒 PCR扩增试剂,购自TaKaRa公司;PCR扩增引物,由上海生工生物工程技术有限公司合成;限制性内切酶 *Hinf*I、*Hae*III,购自纽英伦生物技术(北京)有限公司;DNA纯化回收试剂盒,购自上海申能博彩生物科技有限公司。

1.2 方 法

1.2.1 菌株计数与分离 称取1 g混合曲样装于99 mL无菌水并带玻璃珠的三角瓶中,不断摇动30 min后静置澄清,用无菌吸管吸取0.5 mL菌悬液于装有4.5 mL无菌水的试管中,进行系列稀释,取 10^{-3} 、 10^{-4} 、 10^{-5} 稀释液涂布平板,28℃培养3~4 d后进行菌落计数,挑取形态不同的菌落分别纯化并保存。

1.2.2 DNA的提取 参照文献[9]方法。用接种环取两环旺盛生长于斜面上的酵母菌细胞,悬浮于500 μ L裂解液(50 mmol/L Tris, 250 mmol/L NaCl, 50 mmol/L EDTA, 0.3 g/dL SDS, pH 8)中,加入200 μ L直径为425~600 mm的玻璃珠,涡旋3 min后,65℃水浴1 h,13 000 g离心10 min,上清液稀释300倍直接作为PCR扩增模板。

1.2.3 5.8S-ITS RFLP分析 根据White等的方法,用引物 *its1* (5'-TCC GTA GGT GAA CCT GCG G-3')和 *its4* (5'-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3')扩增分离菌株的5.8S-ITS序列^[10]。PCR扩增条件:95℃5 min,40个循环(94℃40 s, 55℃40 s, 72℃30 s),最后72℃延伸10 min。PCR产物用1 g/dL琼脂糖凝胶电泳检测。5.8S-ITS序列扩增产物纯化后,分别用 *Hinf*I或 *Hae*III内切酶进行酶切,酶切产物在3 g/dL的琼脂糖凝胶上电泳,用自动凝胶成像系统拍照,依照酶切图谱对所有菌株进行归类。

1.2.4 26S rDNA PCR扩增和测序 根据5.8S-ITS RFLP分析结果,从不同酶切谱带类型中随机选取代表菌株,按照Kurtzman等的方法,用引物 NL1(5'-GCA TAT CAA TAA GCG GAG GAA AAG-3')和 NL4(5'-GGT CCG TGT TTC AAG ACG G-3')PCR扩增代表菌株26S rDNA近5'端的D1/D2区域^[4]。PCR扩增条件:95℃5 min,40

个循环(94 °C 40 s, 55 °C 40 s, 72 °C 30 s), 最后 72 °C 延伸 10 min。所得 PCR 产物送上海生工生物工程技术有限公司纯化后, 用 PE 公司 BigDye 循环测序试剂盒在 ABI 377 型 DNA 自动测序仪上进行直接双向测序。

1.2.5 构建系统发育树 将所测代表菌株 26S rDNA D1/D2 区域序列用 Blast 软件在 GenBank 数据库中进行相似性比较, 选取同源性较高的相关菌株的 26S rDNA D1/D2 区域序列作为参比对象, 用 ClustalX 软件^[11]按照最大同源性的原则进行多序列比对。采用 MEGA3.1 软件包根据 Kimura 两参数法^[12]计算进化距离, 用邻接法^[13]构建系统进化树。进化树拓扑分析为 1 000 次重复取样的结果。

2 结果与分析

2.1 菌株的计数与分离

采用稀释平板计数法, 对混合曲样中酵母菌进行计数, 结果见表 1。由表 1 可知, 不同培养基获得菌落数量没有明显差异, 但不同菌落形态、大小和颜色有一定差异。从不同培养基平板上, 共挑选 91 个菌落进行分离纯化, 最终获得 92 株酵母菌纯培养。

表 1 大曲中酵母菌数量的计数结果

Tab. 1 Yeast populations of Daqu

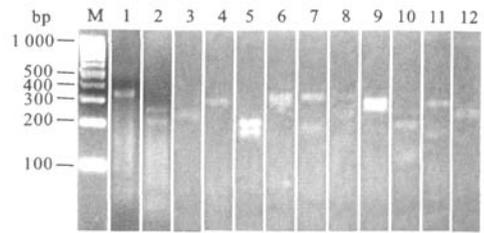
培养基类型	酵母菌数量/(个/g)
麦芽汁培养基	4.8×10^5
马铃薯葡萄糖培养基	4.3×10^5

2.2 5.8S-ITS RFLP 分析

以 its1 和 its4 为引物, 特异性地扩增 92 株酵母菌 5.8S-ITS 区段, 所有供试菌株均可获得 PCR 产物, 扩增片段大小约为 600 bp 左右。利用限制性内切酶 *Hinf* I 或 *Hae* III 对扩增片段进行酶切, 电泳后产生了丰富的谱带类型。*Hinf* I 酶切后产生了 12 种不同的图谱类型, 不同类型包含的酶切片段数目不同, 多数为 1~3 条带, 最大的约为 300 bp, 其它条带大小不同, 为多态性片段, 见图 1。根据 5.8S-ITS 限制性内切酶谱带类型, 将 92 株酵母菌初步分为 12 个类群。

2.3 26S rDNA 测序和系统发育分析

根据 5.8S-ITS RFLP 分析结果, 从 12 个类群中随机选取代表菌株进行 26S rDNA D1/D2 区域序列测定, 将序列结果提交 GenBank 进行相似性搜索, 选定其中同源性较高的相关菌株并为之构建



M. DNA 标准相对分子质量; 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 分别为 DQY1, DQY2, DQY3, DQY4, DQY5, DQY6, DQY17, DQY56, DQY68, DQY70, DQY76, DQY78。

图 1 代表菌株的 5.8S-ITS rDNA 的 *Hinf* I 限制性内切酶图谱

Fig. 1 Restriction patterns of 5.8S-ITS rDNA of representative strains digested with *Hinf* I

系统发育树, 见图 2。从系统发育树来看, 12 个序列与 9 个已知酵母菌属有同源性, 分别是 *Saccharomyces*、*Pichia*、*Zygosaccharomyces*、*Debaryomyces*、*Candida*、*Endomyces*、*Rhodotorula*、*Hanseniaspora*、*Issatchenkia*, 其中以 DQY1、DQY2、DQY3、DQY4、DQY5、DQY6、DQY17、DQY68、DQY70、DQY76 和 DQY78 为代表的菌株分别与已知酵母菌种 *Saccharomyces cerevisiae*、*Pichia deserticola*、*Zygosaccharomyces bailii*、*Debaryomyces hansenii*、*Candida pseudolambica*、*Endomyces fibuliger*、*Rhodotorula mucilaginosa*、*Candida fermentati*、*Issatchenkia orientalis*、*Candida quercitrusa*、*Candida tropicalis* 具有较高的同源性($\geq 99\%$), 而以 DQY56 为代表的菌株与已知种同源性低于 99%, 可能为潜在的新种。

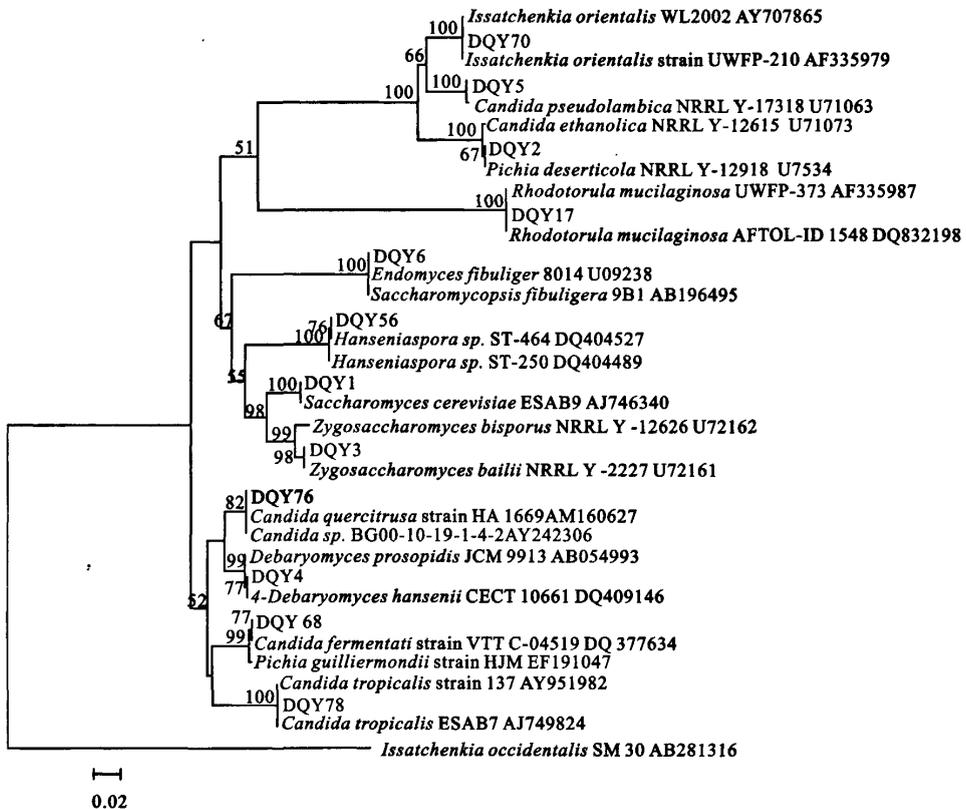
3 结语

3.1 5.8S-ITS RFLP 指纹技术可用于分离菌株的分类和鉴定

自 Esteve-Zarzoso 等于 1999 年首次将 5.8S-ITS RFLP 指纹技术应用食品和发酵饮料中酵母菌的分类和鉴定以来, 该技术已广泛用于食品中酵母菌的分类及鉴定。Covadonga 等对橘汁中分离获得 92 株酵母菌用 5.8S-ITS RFLP 指纹技术进行鉴定, 正确鉴定率达 98%^[5]。Naumova 等采用 5.8S-ITS RFLP 指纹技术对酵母属的一些菌株进行研究, 进一步证实该方法在酵母菌分类、鉴定中的有效性^[14]。本研究中用 5.8S-ITS RFLP 指纹技术对分离到的 92 株酵母菌进行分组, 获得了 12 个不同类群。从 12 个类群代表菌株 26S rDNA D1/D2 区域序列测序结果看, 两种酶不仅可在属级水平上对

分离菌株进行鉴定,而且还可将属内菌株在种水平上进行区分。与传统的分类技术相比,这种方法重

现性好,稳定性高,具有简单、快速、准确的优点。



每个分支点上的数字为引导值的支持百分率;括号里的数字表示序列的登录号;刻度尺表示每个核苷酸位置的替换率为 2%。

图 2 代表菌株 26S rDNA D1/D2 区域序列系统发育树

Fig. 2 Phylogenetic tree constructed from 26S rDNA D1/D2 domain sequence of representative strains from Daqu

3.2 常规分离培养技术是研究微生物种群结构不可缺少的手段

近年来,分子生物学技术的发展使微生物生态学从可培养技术转向了非培养分析法。这种方法由于不需要培养微生物就能有效分析复杂微生物群落的多样性而越来越受到重视^[15]。虽然非培养分析法为研究和揭示微生物多样性而得到极大的拓展,但是要了解微生物的生态功能,仍需要得到它们的纯培养,因此传统分离培养工作仍然是研究

微生物多样性不可缺少的手段。

本次研究工作中,对 12 个类群代表菌株的 26S rDNA D1/D2 区域序列进行测序,其中有 1 个类群代表菌株 DQY56 与 GenBank 数据库已知种同源性低于 99%。从系统进化分析结果看,它可能为潜在的新种,这既反映了大曲中酵母菌的种群结构具有自己的独特性,而且也表明大曲中仍有尚未被分离培养的酵母菌。

参考文献(References):

- [1] 姚万春,唐玉明,任道群,等.泸州老窖国窖曲曲坯层次间微生物差异研究[J].酿酒,2005,32(5):35-36.
YAO Wan-chun, TANG Yu-ming, REN Dao-qun, et al. Study on the differences of microbes in the different layers of guojiao Daqu[J]. *Liquor Making*, 2005, 32(5): 35-36. (in Chinese)
- [2] 孙家芳.关于大曲中有效菌种的培养及应用的探索[J].酿酒,2005,32(1):16-17.
SUN Jia-fang. Application and cultivation of effective microzyme in daqu[J]. *Liquor Making*, 2005, 32(1): 16-17. (in

Chinese)

- [3] 施安辉, 关纪奎, 张文璞, 等. 徐坊大曲的微生物区系及其优势菌的鉴定[J]. 酿酒科技, 2001(6): 26-28.
SHI An-hui, GUAN Ji-kui, ZHANG Wen-pu, et al. Analysis of microbial species in xufang Daqu & determination of the dominant microbes[J]. *Liquor-making Science & Technology*, 2001(6): 26-28. (in Chinese)
- [4] Esteve-Zarzoso B, Belloch C, Uruburu F, et al. Identification of yeasts by RFLP analysis of the 5.8S rRNA gene and the two ribosomal internal transcribed spacers[J]. *Int J Syst Bacteriol*, 1999(49): 329-337.
- [5] Covadonga R, Jacqueline K, Burns S, et al. Yeast species associated with orange juice; evaluation of different identification methods[J]. *Appl Environ Microb*, 2002(4): 1955-1961.
- [6] Kurtzman C P, Robnett C J. Identification and clinically important ascomycetous yeasts based on nucleotide divergence in 5' end of the large-subunit (26S) ribosomal DNA gene[J]. *J Clin Microbiol*, 1997(35): 1216-1223.
- [7] Kurtzman C P, Robnett C J. Identification and phylogeny of ascomycetous yeasts from analysis of nuclear large subunit (26S) ribosomal DNA partial sequence[J]. *Antonie Leeuwenhoek*, 1998(3): 331-371.
- [8] Fell J W, Boekhout T, Fonseca A, et al. Biodiversity and systematics of basidiomycetous yeasts as determined by large-subunit rDNA D1/D2 domain sequence analysis[J]. *Int J Syst Evol Microbiol*, 2000, 50: 1351-1371.
- [9] Gadanho M, Almeida J M G C F, Sampaio J P. Assessment of yeast diversity in a marine environment in the south of Portugal by microsatellite-primed PCR[J]. *Antonie van Leeuwenhoek*, 2003, 84: 217-227.
- [10] White T J, Bruns T D, Lee S, et al. PCR protocols; a guide to methods and applications[M]. New York: Academic Press, 1990: 315-322.
- [11] Thompson J D, Gibson T J, Plewniak F, et al. The ClustalX windows interface: Flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools[J]. *Nucleic Acids Res*, 1997, 25: 4876-4882.
- [12] Kimura M. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences[J]. *J Mol Evol*, 1980, 16: 111-120.
- [13] Saitou N, Nei M. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees[J]. *Mol Biol Evol*, 1987(4): 406-425.
- [14] Naumova E S, Zholudeva M V, Martynenko N N, et al. The molecular genetic differentiation of cultured *Saccharomyces* strains[J]. *Microbiology*, 2005, 74(2): 179-187.
- [15] Cocolin L, Bisson L, Mills D. Direct profiling of the yeast dynamics in wine fermentations[J]. *FEMS Microbiol Lett*, 2000, 189: 81-87.

(责任编辑: 李春丽)

您的包装能否确保产品的质量安全?

肉眼看得见的问题 您来解决
肉眼看不见的问题 Labthink 来解决



Labthink

您了解, 您信任!

历经生产、运输、仓储、上架销售等各个环节, 如果包装存在任何质量隐患, 都可能导致产品出现霉变、潮解、破损、保质期缩短等严重问题。Labthink兰光——包装检测国际知名品牌, 为您提供全方位包装质量与安全解决方案。

济南兰光机电技术有限公司
青岛电话: 0531-88021156
E-mail: labthink@labthink.com
WWW.LABTHINK.COM