

T-RFLP 和 454 焦磷酸测序方法分析 制麦过程细菌群落的动态变化

邱 然^{1,2,3}, 陆 健^{*1,2,3}

(1. 江南大学 生物工程学院, 江苏 无锡 214122; 2. 江南大学 工业生物技术教育部重点实验室, 江苏 无锡 214122; 3. 粮食发酵工艺与技术国家工程实验室, 江南大学, 江苏 无锡 214122)

摘要: 确定微生物菌群特性是制麦管理与优化的关键一步。本研究以两个不同收获年份及两个同批次不同制麦方式的大麦为样品, 采用两种非培养计数方法, 即 16S 核糖体 RNA (16S rRNA) 末端限制片段长度多态性 (T-RFLP) 和 454 焦磷酸测序, 检测制麦过程细菌及乳酸菌菌群结构, 以期全面、准确分析细菌群落结构及动态变化。研究结果显示: 不同收获年份的大麦细菌菌群结构存在差异, 整个细菌群落结构随着制麦过程而发生变化, 而不同发芽方式之间并没有明显的区别。454 焦磷酸测序结果显示乳酸菌有 139 个运算分类单元 (OTU), 所有样品有 88% 的序列覆盖了 5 个 OTU (如 *Weissella*、*Lactobacillus* 和 *Leuconostoc* 菌属), 说明制麦过程乳酸菌的多样性较低, 优势乳酸菌相对数量随着制麦条件变化而波动, 并且大麦的收获年份和制麦环境也影响乳酸菌的菌群结构。

关键词: 麦芽; 微生物菌群; 乳酸菌; 末端限制片段长度多态性

中图分类号: TS 261.2 文章编号: 1673-1689(2019)04-0071-07 DOI: 10.3969/j.issn. 1673-1689.2019.04.011

Bacterial Community Dynamics during Malting Based on T-RFLP and 454 Pyrosequencing Profiles

QIU Ran^{1,2,3}, LU Jian^{*1,2,3}

(1. School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 2. Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 3. National Engineering Laboratory for Cereal Fermentation Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: Characterization of the microflora during malting is an essential step towards process management and optimization. The aim of this study was to characterize the bacterial communities using two culture-independent methods, including Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism (T-RFLP) and 454 pyrosequencing, targeting the 16S rRNA gene. In order to analyze bacterial communities and dynamics fully and precisely, the same batch of barley originated from

收稿日期: 2016-10-09

基金项目: 国家 973 计划项目 (2013CB733602); 国家 863 计划项目 (2013AA102109); 江苏高校优势学科建设工程资助项目 (NCET-20180121-3)。

* 通信作者: 陆 健 (1968—), 男, 博士, 教授, 博士研究生导师, 主要从事啤酒酿造微生物与酶技术研究。E-mail: jlu@jiangnan.edu.cn

引用本文: 邱然, 陆健. T-RFLP 和 454 焦磷酸测序方法分析制麦过程细菌群落的动态变化[J]. 食品与生物技术学报, 2019, 38(04): 71-77.

two harvest years using two malting methods was studied in entire bacterial community and lactic acid bacteria (LAB). The results showed that the bacterial community structure of barley from different years was different and changed during the malting process, but there was no significant difference between the two malting methods. Zooming in the LAB community using 454 pyrosequencing revealed a total of 139 operational taxonomic units (OTUs). LAB diversity appeared relatively limited since 88% of the sequences were covered by the same five OTUs (representing members of *Weissella*, *Lactobacillus* and *Leuconostoc*) present in all samples investigated. Fluctuations in the relative abundances of the dominant LAB were observed with the process conditions. In addition, both the year of harvest and malting environment influenced the LAB community structure.

Keywords: malt, microbial community, LAB, T-RFLP

制麦是一个复杂的生物学过程,包括诸多的生理生化反应。大麦在发芽过程中,激活和合成水解酶类,降解蛋白质和淀粉等大分子物质,转化成氨基酸和糖类,供啤酒酵母生长代谢使用^[1]。在制麦生态系统中,除了发芽的大麦,还有丰富的微生物菌群^[2],其代谢产物对麦芽品质影响很大,并最终影响啤酒质量。微生物的性质和数量会对制麦过程和最终产物啤酒产生有利或不利的影响^[3]。因此,深入了解制麦过程中微生物菌落的性质和数量,有利于控制制麦过程和改善麦芽品质,进而提升啤酒质量^[4]。

确定大麦和麦芽微生物组成的传统方法是采用涂平板计数和菌落鉴定的方法。这种方法首先要进行微生物培养。在现阶段,自然界中大多数的微生物都是不可培养的,在实验室中能够培养的菌种仅占自然界微生物种类的极小部分,还有相当多的微生物因无法培养而未被人们所认识。因此,传统方法用于研究制麦生态系统中总微生物构成可能会出现严重偏差,导致实验结果与实际不一致^[5]。目前,传统方法正逐渐被不需要进行微生物培养的分子生物学方法所补充和替代^[6],如指纹识别技术、基因测序等。其中末端限制片段长度多态性(T-RFLP)分析技术不依赖于细菌培养,并且整合了自动测序仪的高分辨率和高通量特征,重现性好,分辨率高,自动化程度高,能迅速产生大量重复、准确的数据。对于分析复杂的群落结构比其他的指纹识别技术具有更明显的优势,已经被广泛用于生态系统和栖息地中的微生物菌群的多样性和分子动力学的研究^[7]。随着科技的不断进步,454焦磷酸测序技术已经能快速鉴定微生物菌落,比克隆和 Sanger 测序更

有效,避免了经典分析技术在多样性研究中的局限性以及由此引起的种群丢失、结构不清等弊病,可以直接反映出生态系统中微生物原始的构成情况,也是研究微生物群体多样性的重要手段。然而,到目前为止,还少见 T-RFLP 和 454 焦磷酸测序方法用于分析麦芽制造过程中微生物多样性的报道。

乳酸菌在制麦和酿造工业已有较多应用,如利用乳酸菌在制麦和酿造过程中控制腐败和真菌毒素,以提高麦芽质量和安全性^[8]。某些特定的乳酸菌会产生抗菌物质与溶解氧竞争,限制有害细菌的生长,缩短麦汁过滤时间^[9]。LAITILA 等^[10]证明在浸麦水中添加乳酸菌可以提高大麦发芽力。尽管在啤酒酿造工业中乳酸菌的重要性已经得到了高度认可,但到目前为止,大部分研究主要集中在个别菌株上^[11],与大麦和麦芽制造过程相关的乳酸菌菌群结构和特性尚未得到详细研究。

本研究以两个不同收获年份、同批次但不同制麦方式的大麦为样品,利用 T-RFLP 技术系统考察了细菌菌落结构变化情况,并重点研究了制麦过程中的乳酸菌。另外,使用 454 焦磷酸测序技术对乳酸菌 16S rRNA 基因进行测序,研究制麦过程中内源性乳酸菌菌群特性。

1 材料与方法

1.1 材料和仪器

实验材料:2012 年和 2013 年的国产江苏啤酒大麦单二。麦芽制造由塔式制麦系统和微型制麦系统按照相同的制麦工艺进行。浸麦:4 周—7 d—5 周—7 d—5 周—3 d,浸麦度 43%~44%;发芽:15 ℃,120 h;

干燥:45℃ 3 h—1 h—55℃ 3 h—1 h—65℃ 3 h—1 h—70℃ 1 h—1 h—75℃ 1 h—1 h—87℃ 3 h。取样点设在发芽 1 d、发芽 5 d 和最终成品麦芽。所有供试样品由中粮麦芽(大连)有限公司提供。

实验仪器:微型制麦设备,澳大利亚 Jeo White 麦芽公司产品;PCR 仪,Bio-Rad T100,美国伯乐公司产品;变性梯度凝胶电泳仪,Bio-Rad;凝胶成像系统,美国 UVP 公司;荧光仪,Invitrogen Qubit® 2.0,赛默飞世尔公司产品;自动测序仪,373A,美国应用生物系统公司产品。

1.2 细菌总 DNA 提取

准确称量大麦及麦芽样品 150 g 装入带有无菌小玻璃珠(212~300 μm)的 500 mL 三角瓶中,向每个瓶中加入 100 mL Tris-HCl 缓冲液(pH 8, 10 mmol/L),室温,160 r/min 摇床振荡 1 h。离心,弃上清后,将所得沉淀加入液氮在研钵中研磨数次,取出装入 1.5 mL 离心管中,-20℃ 冷却保藏,待用。按照文献[4]的方法提取细菌总 DNA。

1.3 T-RFLP 分析

用于 16S rRNA 基因 T-RFLP 分析的 2 套引物分别为细菌通用引物 516F (5'-TGCCAGCAG CCGCGGTA-3';5'FAM-labelled) 和 1541R (5'-AAGGAGGTGATCCAGCC-3');乳酸菌引物 7F (5'-AGAGTTTGATYMTGGCTCAG-3';5'HEX-labelled) 和 677R (5'-CACCGCTACACATGGAG-3')。其中 7F 为非特异引物,677R 是根据 4 个重要乳酸菌^[12]设计的,包括 *Lactobacillus*、*Leuconostoc*、*Pediococcus* 和 *Weissella*。

反应体系为 20 μL,其中含有 0.15 mmol/L 的 dNTP,0.5 mmol/L 引物,1 单位的 *Taq* DNA 聚合酶,1 倍的 PCR 反应缓冲液,1 μL 基因组 DNA。

运行程序为:94℃ 预变性 2 min,前 30 个循环在 94℃ 变性 45 s,64℃ (通用引物) 或 66℃ (乳酸菌引物) 退火 45 s,72℃ 延伸 45 s,循环 30 次,结束后 72℃ 保持 10 min。被标记的 PCR 产物(约 200 ng)用 *Msp* I 或 *Hinf* I 在 37℃ 消化 4 h,最后用 373A 自动测序仪对限制性片段进行分析(重复两次)。

利用 T-REX 软件分析每个样本的数据和峰值区域。根据电泳图谱对 T-RFLP 数据进行出峰分类。利用 DNA 序列限制性酶切位点在线服务平台(<http://rna.lundberg.gu.se/cutter2/>) 预测 DNA 扩增片段的酶切位点。对非靶标 DNA 末端限制性片段

去除后,用 Sorensen 相似性指数分析数据,运用非加权组平均法(UPGMA)进行聚类分析。为了区分峰值与噪音,数据分析仅局限于大于样品总峰值区域 1% 的 TRF。利用微生物菌群分析网站(MiCA)的电脑模拟消化法产生的数据库和本研究的 454 测序结果来确定微生物种类。MiCA 网站有利用核糖体数据库 RDP Release 10 编辑得到的高质量 16S rRNA 基因序列。

1.4 16S rRNA 基因扩增子的测序

运用 454 测序仪研究与制麦相关的乳酸菌菌群。用正向引物 341F (5'-CCTACGGGAGGCAG CAG-3') 和乳酸菌反向特异引物 677R 扩增样品。扩增出约 423 bp 的产物,覆盖了 16S rRNA 基因 V3~V4 区域,适合于 454 焦磷酸测序^[13]。对 DNA 样品进行 2 次 PCR 扩增,然后用琼脂糖凝胶电泳对 PCR 产物进行验证,扩增产物使用 Qiagen PCR 纯化试剂盒进行纯化。用荧光仪对纯化后的产物定量,取等量浓度产物进行测序。测序过程按照 454 罗氏 GS FLX 说明书进行。利用 Biopython 将序列根据 5' 和 3' 特有标记对应到相应的样品。每 50 bp 移动窗口中,根据 Phred 最小值 25 进行序列删减(0.3% 的误差率)。最短和最长序列设定为 315 和 330 个核苷酸,舍弃不确定的碱基序列和同源多聚体数量多于 8 的序列。用 Uchime 嵌合体检测程序检测嵌合体,去除嵌合体后与 SILVA 参考序列比对。利用临界算法去掉 3% 的差异序列,将序列分成不同的 OTU。通过在 GenBank 上比对来确定该 OTU。再利用核糖体数据库项目(RDP)的网站(<http://rdp.cme.msu.edu/>)进一步确定结果。将两次乳酸菌数据混合,剔除单体(在所有样本中仅有一个序列的 OTU)后,利用 Mothur 和 R 生成稀疏曲线,评估样本和 OTU 数量。

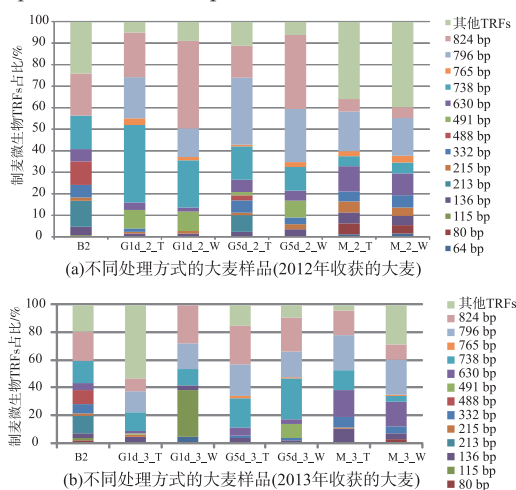
2 结果与讨论

2.1 T-RFLP 分析

为了研究制麦过程中微生物菌群结构,采用 T-RFLP 技术研究完整的细菌菌群和乳酸菌菌群。末端限制性片段长度多态性方法是将 PCR 引物中的一条进行荧光标记,用合适的限制性内切酶将 PCR 扩增产物消化,在酶切后产生的许多不同长度的限制性片段中只有末端带有荧光标记的片段才能被监测到。通过分析这些荧光信号生成的 T-RFLP 图

谱,可以揭示样品中微生物的数量、种类和种群规模,从而帮助了解微生物菌群的结构、功能及动态变化。

2.1.1 细菌菌群 在 14 个样本中 (见图 1), *Msp* I 消化获得 38 个不同细菌的 TRF, *Hinf* I 消化获得 53 个 TRF。每个样品用 *Msp* I 消化后的 TRF 数量为 4~16 个, 用 *Hinf* I 消化后的 TRF 数量为 6~26 个, 说明制麦过程细菌多样性相对有限。图 1 为采用 T-RFLP 技术分析收获于 2012 年[图 1(a)]和 2013 年[图 1(b)]江苏单二大麦在不同制麦方式下微生物末端限制片段的相对数量和分布情况(*Hinf* I 消化, 取两次实验的平均值。峰面积超过所有样品总面积的 10% 的 TRF 被保留, 其他 TRF 列为一组 “其他 TRFs”)。几乎所有样品都有少数的特征 TRF。所有样本中有 6 个 TRF 总量超过 3%, 包括 136、332、630、738、796 bp 和 824 bp, 分别占总样本的 4%、3%、7%、16%、18% 和 20%。样本中均有 136、738 bp 和 824 bp 的 TRF。796 bp 的 TRF 存在所有非大麦样品中。这些 TRF 对应种属如下: 136 bp: *Enterobacter* 和 *Sphingobacterium*; 332 bp: *Wautersiella* 和 *Cryseobacterium*; 630 bp: *Curtobacterium* 和 *Propionobacterium*; 738 bp: *Weissella*, *Lactobacillus*, *Lactococcus* 和 *Streptococcus*; 796 bp: *Acinetobacter* 和 *Stenotrophomonas*; 824 bp: *Leuconostoc* 和 *Pseudomonas*。

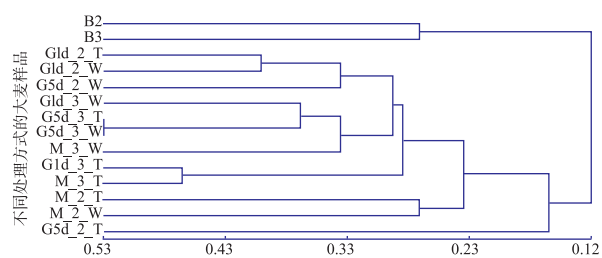


B: 大麦; G1d: 发芽 1 d 的大麦; G5d: 发芽 5 d 的大麦; M: 麦芽; 2: 2012 年收获; 3: 2013 年收获; T: 塔式制麦; W: 微型制麦
图 1 T-RFLP 分析制麦微生物末端限制片段的相对数量和分布情况

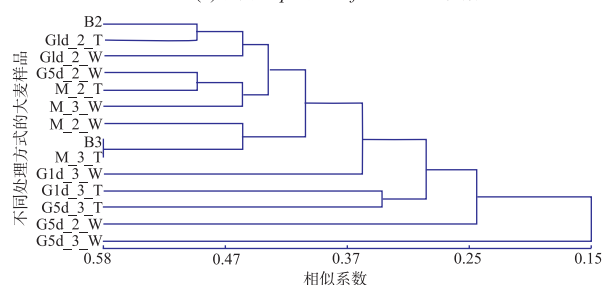
Fig. 1 Relative abundance and distribution of the most dominant bacterial terminal restriction fragments obtained by T-RFLP analysis

其中 *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Streptococcus* 和 *Weissella* 常见于发芽过程^[14]。大麦中的 TRF 个数约占有所有样品的 75%, 也就是说制麦环境中增加了 1/3 的外源微生物。

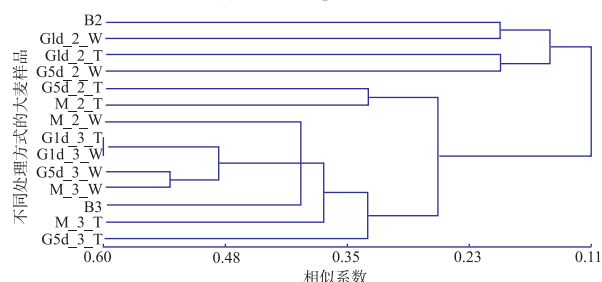
为了比较不同样品中细菌菌落结构的区别, 用 NTsys 2.1e 软件对 T-RFLP 数据进行聚类分析。聚类结果表明, 样品基本可以根据工艺步骤进行分组 (图 1(a)), 说明细菌菌落结构随着制麦工序的不同而变化。两个年份大麦样品被分为一组; 发芽过程的绿麦芽样品和最终的麦芽样品分为一组。不同发芽方式之间并没有明显的区别。另外, 相同年份的绿麦芽和最终成品麦芽相似度更高。大麦和麦芽的细菌菌落相似性只有 12%。微生物菌群结构的变化主要是因为大麦在发芽过程所处环境不同所引起, 如发芽温度 16~20 °C, 非常适合微生物生长繁殖, 导致微生物菌落在整个发芽过程显著增加。同样,



(a) 细菌 *Msp* I 和 *Hinf* I T-RFLP 数据



(b) 乳酸菌 *Msp* I T-RFLP 数据



(c) 江苏大麦制麦中乳酸菌的 454 测序检测结果

图 2 非加权组平均法 (UPGMA) 聚类图

Fig. 2 Unweighted-pair group method with arithmetic mean (UPGMA) dendrogram

成品麦芽经过 80~85 °C 的高温焙焦,杀灭了大部分绿麦芽上的微生物,导致成品麦芽中微生物数量和种类减少。

2.1.2 乳酸菌菌群 经过 T-RFLP 分析,乳酸菌有 30 个不同的 TRF,用 *Msp* I 酶切后每个样品有 4~15 个 TRF。用乳酸菌特异性引物 (7F-677R) 检测乳酸菌 *Lactobacillus*、*Leuconostoc*、*Pediococcus* 和 *Weissella*,与整个细菌菌落相似,主要的 TRF 存在于所有研究样品中,如图 3 所示。然而,与整个细菌菌落相反,在过程阶段未进行区分,其树形图相对较分散,见图 2(b)。T-RFLP 分析是基于扩增片段经过酶切后长度不同。所有样品中 3 个最主要的 TRF 分别对应 553、578 bp 和 583 bp,相应峰面积分别为 39%、15%和 23%。根据这些 TRF 的模拟酶切结果,推测这 3 个 TRF 分别是 *Leuconostoc*、*Lactobacillus* 和 *Weissella*。

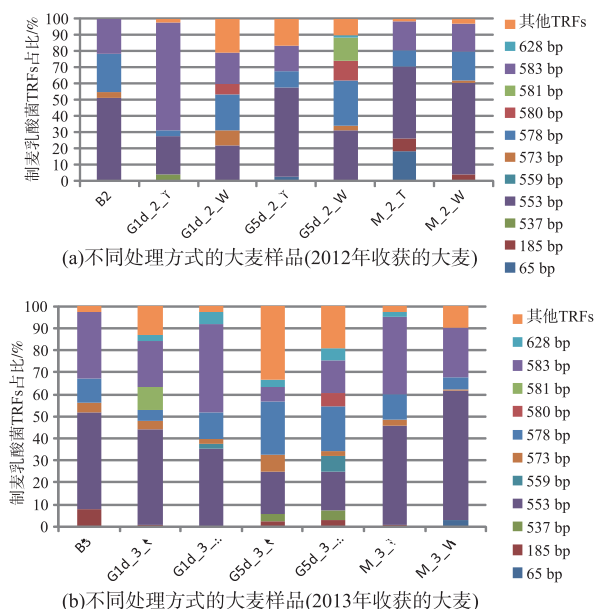


图 3 T-RFLP 分析制麦乳酸菌末端限制片段的相对数量和分布情况

Fig. 3 Relative abundance and distribution of the most dominant bacterial terminal restriction fragments representing lactic acid bacteria obtained by T-RFLP analysis

2.2 乳酸菌 16S rRNA 基因扩增子的焦磷酸测序
采用 454 焦磷酸测序技术重点研究乳酸菌菌

群情况,排除 3%以上差异的序列后分成 139 个运算分类单元(OUT),其中 102 个与乳酸菌有关。发芽大麦和麦芽的非乳酸菌序列占比很少,约 2%。大麦的非乳酸菌序列占比较多,约 13%,这可能是由于大麦样品的乳酸菌含量较低。传统 MRS 平板计数实验表明,大麦中细菌有 10^7 cfu/g,乳酸菌大约有 1×10^3 cfu/g,发芽后直至麦芽中乳酸菌含量达到 $1 \times 10^6 \sim 1 \times 10^8$ cfu/g^[15]。所以大麦样品中存在较多的非乳酸菌序列可能是因为引物错配导致一些非特异 DNA 被扩增。除去单体后,与乳酸菌相关的序列有 33 624 个,平均 317 bp,属于 47 个 OTU。每个样本序列数量为 517~4 874 (平均 2 402),每个 OUT 序列数量为 2~9 548。有 14 个 OTU 序列数量大于所有样品总数的 0.1%,这 14 个主要的 OTU 占每个样本中乳酸菌序列超过 98%,如表 1 和图 4 所示。在所有样本中,至少有 97% 的序列与大麦样本有关,表明在麦芽生产过程中,大麦携带的微生物起着重要作用,T-RFLP 分析也证明了此结论。此外,5 个主要的 OUT:OTU100、101、102 为 *Weissella* 属(魏斯菌属),OTU93 为 *Lactobacillus* 属(乳杆菌属)和 OTU98 为 *Leuconostoc* 属(明串珠菌属)。这 5 个 OUT 在样品中均存在,覆盖率达 88%。

魏斯菌属是制麦过程中最主要的乳酸菌,有 3 个主要 OTU,占所有序列的 63%。乳杆菌属是第 2 优势属,占所有序列的 20%。第 3 是明串珠菌属,占所有序列的 11%。由图 4 可知,2 个不同年份的样品间乳酸菌菌群存在巨大差异:2012 年的乳杆菌比 2013 年更丰富,2013 年收获的大麦乳杆菌相对含量与 2012 年相比急剧下降;魏斯菌属在 2013 年更加丰富,在整个过程中相对含量始终较高,平均为 82%。不同年份魏斯菌属的主要 OUT 也不同,2012 年以 OTU102 为主,而 2013 年以 OTU101 为主。其次,两种发芽方式主要的种属也不同:2012 年塔式制麦以乳酸杆菌为主,而微型制麦以魏斯菌属为主。此外,*Pediococcus* 几乎只在 2012 年的微型制麦系统中检测到,发芽 1 d 后占乳酸菌菌群 11.2%,5 d 后占 4.6%,占麦芽的 12.3%。对于大麦来说,片球菌在 2012 年占 32.6%,在 2013 年含量较低,仅占大麦乳酸菌菌群 1.6%,在制麦过程中约占 0.1%。

表 1 制麦过程乳酸菌主要运算分类单元

Table 1 Lactic acid bacteria operational taxonomic units identified in this study

OTU	科	属	相近属	登记号	同源性	序列数
OTU 102	Leuconostocaceae	<i>Weissella</i>	<i>Weissella soli</i>	GU470977.1	100.0	9 548
OTU 101	Leuconostocaceae	<i>Weissella</i>	<i>Weissella</i> sp.	JX826529.1	100.0	8 287
OUT 093	Lactobacillaceae	<i>Lactobacillus</i>	<i>Lactobacillus</i> spp.	AB671287.1	100.0	4 908
OTU 098	Leuconostocaceae	<i>Leuconostoc</i>	<i>Pseudomesenteroides</i>	JX866706.1	100.0	3 555
OUT 100	Leuconostocaceae	<i>Weissella</i>	<i>Weissella</i> sp.	JQ726614.1	99.7	3 367
OTU 091	Lactobacillaceae	<i>Pediococcus</i>	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	JX679020.1	100.0	1 129
OUT 085	Lactobacillaceae	<i>Lactobacillus</i>	<i>Lactobacillus</i> sp.	JX826575.1	100.0	824
OTU 062	Lactobacillaceae	<i>Pediococcus</i>	<i>Pediococcus parvulus</i>	JQ249066.1	100.0	584
OUT 099	Lactobacillaceae	<i>Lactobacillus</i>	<i>Lactobacillus oligofermentans</i>	AY733084.2	99.0	341
OTU 056	Leuconostocaceae	<i>Leuconostoc</i>	<i>Leuconostoc carnosum</i>	CP003851.1	100.0	316
OUT 094	Lactobacillaceae	<i>Lactobacillus</i>	<i>Lactobacillus iners</i> clone	AY283272.1	100.0	304
OUT 097	Leuconostocaceae	<i>Leuconostoc</i>	<i>Leuconostoc palmae</i>	AM940225.1	95.9	108
OUT 088	Lactobacillaceae	<i>Lactobacillus</i>	<i>Lactobacillus hammesii</i>	AB512777.1	100.0	104
OUT 058	Lactobacillaceae	<i>Lactobacillus</i>	<i>Lactobacillus coryniformis</i>	JQ249069.1	98.7	81

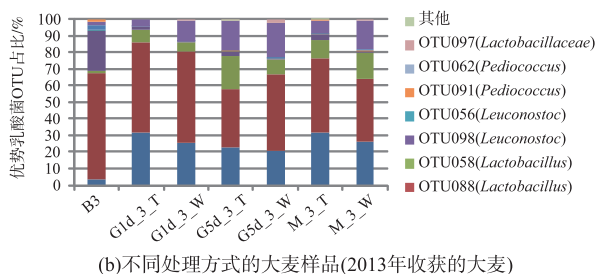
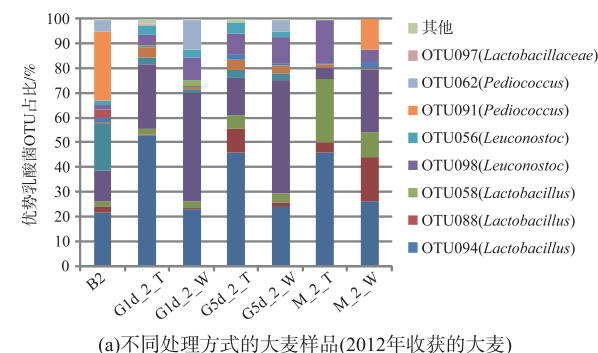


图 4 采用 454 焦磷酸测序技术分析制麦过程中优势乳酸菌的相对数量和分布情况

Fig. 4 Relative abundance and distribution of the most dominant lactic acid bacteria during malting based on 454 pyrosequencing

与 T-RFLP 相比, 聚类分析基本是把样品按照年份分组, 见图 2(c)。用 454 焦磷酸测序分析发现: 在麦芽生产过程中, 不同制麦方式的同一批次大麦中乳酸菌菌落结构具有显著差异。例如, *Pediococcus*

仅在微型制麦系统中被检测到。据报道, *Pediococcus* 可以提高麦芽质量^[10]; 有利于制麦过程中有益酵母生长并且限制有害细菌和镰刀真菌生长, 同时提高麦芽的特性, 包括降低麦汁粘度和 β -葡聚糖含量, 提高木聚糖酶和微生物 β -葡聚糖酶活性, 最终改善麦芽过滤性能。另外, 微型制麦的麦芽脆度较高, 未溶解的大麦较少, 这些都有助于提高麦芽质量。但 *Pediococcus* 是否起作用还有待进一步研究。

3 结 语

在制麦过程中, 大麦中整个细菌菌落组成有限, 通过 T-RFLP 分析发现菌落结构在制麦过程中是变化的, 可能是在制麦过程中受环境影响所致。454 焦磷酸测序法分析乳酸菌菌群结果表明: 在样品中均有 5 个 OTU, 分别是代表了 *Weissella*、*Lactobacillus* 和 *Leuconostoc*。454 测序结果还表明, 不同年份收获的大麦其菌群结构不同, 而 T-RFLP 法并未检测到这点。此外, 454 测序结果显示: 同一批次大麦在不同的制麦系统中乳酸菌菌落结构也存在显著不同。

T-RFLP 和 454 焦磷酸测序结果都证明大麦本身携带的微生物种类与制麦过程条件无关。然而, 微生物的相对数量却由制麦过程工艺参数决定。随着对这些微生物的深入了解及有效控制, 本研究结果将作为微生物制麦技术的基础依据。

参考文献:

[1] QIU Ran, YANG Wenzhou, ZHANG Cunling. Changes in endopeptidase activity, content of hordein and free amino acids in

- barley seeds during germination[J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**, 2007, 26(5):48-52. (in Chinese)
- [2] FLANNIGAN B. The microbiota of barley and malt[M]. New York: Springer US, 2003: 113-180.
- [3] LAITILA A. Microbes in the tailoring of barley malt properties[D]. Finland: Helsingin Yliopisto, 2007: 107.
- [4] LAITILA A, SARLIN T, RAULIO M, et al. Yeasts in malting, with special emphasis on *Wickerhamomyces anomalus* (synonym *Pichia anomala*) [J]. **Antonie van Leeuwenhoek**, 2011, 99: 75-84.
- [5] 董亮. 制麦过程中麦芽风味的产生机制及外源微生物对风味的影响[D]. 无锡: 江南大学, 2013.
- [6] LIANG Xiaogang, CAI Guolin, ZHANG Zhonghua, et al. Nested PCR-DGGE analysis of the fungi community of Jiangsu local malting barley[J]. **Food and Fermentation Industries**, 2012, 38(8): 1-6. (in Chinese)
- [7] TOLVANEN K E S, KARP M T. Molecular methods for characterizing mixed microbial communities in hydrogen-fermenting systems[J]. **International Journal of Hydrogen Energy**, 2011, 36: 5280-5288.
- [8] LOWE D P, ARENDT E K. The use and effects of Lactic Acid Bacteria in malting and brewing with their relationships to antifungal activity, mycotoxins and gushing: a review[J]. **Journal of the Institute of Brewing**, 2004, 110: 163-180.
- [9] CAMPENHOUT V. Interactions between barley respiratory activity and its microbial community: Towards a controlled germination process[D]. Belgium: Catholic University of Louvain, 2000: 224.
- [10] LAITILA A, SWEINS H, VILPOLA A, et al. *Lactobacillus plantarum* and *Pediococcus pentosaceus* starter cultures as a tool for microflora management in malting and for enhancement of malt processability[J]. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 2006, 54: 3840-3851.
- [11] ROUSE S, SUN F, VAUGHAN A, et al. High-throughput isolation of bacteriocin-producing lactic acid bacteria, with potential application in the brewing industry[J]. **Journal of the Institute of Brewing**, 2007, 113: 256-262.
- [12] HEILIG H G, ZOETENDAL E G, VAUGHAN E E, et al. Molecular diversity of *Lactobacillus* spp. and other lactic acid bacteria in the human intestine as determined by specific amplification of 16S ribosomal DNA[J]. **Applied and Environmental Microbiology**, 2002, 68: 114-123.
- [13] YOUSSEF N, STEIDLEY B L, ELSHAHED M S. Novel high-rank phylogenetic lineages within a sulfur spring (Zodletone Spring, Oklahoma), revealed using a combined pyrosequencing-sanger approach[J]. **Applied and Environmental Microbiology**, 2012, 78: 2677-2688.
- [14] BOKULICH N A, MILLS D A. Differentiation of mixed lactic acid bacteria communities in beverage fermentations using targeted terminal restriction fragment length polymorphism[J]. **Food Microbiology**, 2012, 31: 126-132.
- [15] SU Hongxu, WANG Lu, XU Kai, et al. Preliminary study on variation of microbial community in malting[J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**, 2011, 30(5): 745-749. (in Chinese)

会 议 消 息

会议名称: 第四届持久性、生物蓄积性、有毒物质国际研讨会

会议地点: 深圳 会议时间: 2019 年 6 月 22-23 日

会议介绍: 持久性、生物累积和有毒物质 (PBTs), 包括持久性有机污染物 (POPs), 是一类持久性、生物累积和有毒的污染物, 具有远距离迁移的倾向。由于其对人类的急性、慢性和内分泌干扰毒性, 以及对环境的长期影响, PBTs 目前正受到全世界的关注。因此, 举办第四届持久性、生物累积性和有毒物质国际研讨会, 为科学家提出新的方法和新想法提供一个重要的跨学科论坛。研讨会将为国际专家提供一个论坛, 交流有关其研究领域的最新知识。

主题包括但不限于环境化学、环境毒理学、半挥发性有机物的长距离传输、新型污染物、环境与健康、污染物控制。

研讨会秘书处:

曹罡博士

朱荣淑博士

电话: +86-134-8081-9670

电话: +86-136-6268-7518

电子邮件: caog@hotmail.com

电子邮件: 66150086@qq.com