

## 镇江香醋醋酸发酵过程中细菌群落组成分析\*

许伟<sup>1,2</sup> 张晓君<sup>3</sup> 许泓瑜<sup>2</sup> 许正宏<sup>1,2,\*</sup> 赵立平<sup>3</sup>

(江南大学教育部工业生物技术重点实验室 无锡 214036) (江南大学生物工程学院 无锡 214036)

(上海交通大学生命科学与技术学院 上海 200240)

**摘要** 用免培养法对镇江恒顺香醋醋酸发酵过程中醋醅的细菌群落的结构进行了分析。从醋醅样品中获得的总DNA经PCR扩增建立了16S rDNA克隆文库,共获得96个阳性克隆并进行了测序,以代表性序列构建了系统发育树。通过序列分析将它们分为16个OUTs,其中5个OUTs属于*Lactobacillus*属、2个属于*Acetobacter*属、1个属于*Gluconacetobacter*属、2个属于*Staphylococcus*属、2个属于*Enterobacter*属、2个属于*Pseudomonas*属、1个属于*Flavobacterium*属和1个*Sinorhizobium*属。

**关键词** 醋 细菌 16S rDNA 克隆 序列

中图分类号:Q93 文献标识码:A 文章编号:0253-2654(2007)04-0646-04

**Analysis of Bacterial Communities in Aerobic Solid-Fermentation  
Culture of Zhenjiang Hengshun Vinegar\***

XU Wei<sup>1,2</sup> ZHANG Xiao-Jun<sup>3</sup> XU Hong-Yu<sup>2</sup> XU Zheng-Hong<sup>1,2,\*</sup> ZHAO Li-Ping<sup>3</sup>

(The Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, Southern Yangtze University, Wuxi 214036)

(School of Biotechnology, Southern Yangtze University, Wuxi 214036)

(School of Life Science and Technology, Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200240)

**Abstract** The constitution of the bacterial community in Zhenjiang Hengshun vinegar acetic fermentation was analyzed by culture-independent approach. Total DNA was extracted and amplified using PCR reaction to construct 16S rDNA library, which includes 96 positive clones. Through sequencing of those clones, the phylogenetic tree is illustrated by representative sequences. Based on phylogenetic analyzing, 16 OUTs was obtained, and the composition of microorganisms in Hengshun vinegar fermentation was concluded as below: five OUTs belong to genus *Lactobacillus*, two are genus *Acetobacter*, one genus *Gluconacetobacter*, two genus *Staphylococcus*, two genus *Enterobacter*, two genus *Pseudomonas*, one genus *Flavobacterium*, and one genus *Sinorhizobium*, respectively.

**Key words** Vinegar, Bacteria, 16S rDNA, Clone, Sequence

我国酿醋历史悠久,传统酿醋以固态天然发酵为主,发酵过程中不直接接种纯培养醋酸菌,所用的发酵剂主要为前一批次发酵成熟的醋醅或采用天然接种的方式,因而食醋发酵微生物的主要来源是接种于醋醅中的微生物菌群,同时也受到生产原料、车间环境微生物的影响,不同于欧美国家深层液态发酵食醋工艺中普遍采用的单一的纯培养醋酸菌<sup>[1,2]</sup>。由于受到传统研究方法的局限,人们对

醋酸发酵过程中的微生物群落结构了解非常有限。镇江香醋是我国最具代表性的四大名醋之一。它是以优质糯米为主要原料,采用传统的醋酸固态分层发酵工艺经陈酿而成的香气浓郁、酸而不涩的食醋<sup>[3]</sup>。本文通过免培养法对镇江恒顺香醋醋酸发酵过程中醋醅的细菌群落的结构进行了分析,为进一步的解析其结构和功能关系奠定了基础。

\* 江苏省自然科学基金项目(No. BK2006019),国家自然科学基金资助项目(No. 30600013),教育部长江学者和创新团队发展计划(No. JRT0532)

\*\* 通讯作者 Tel 0510-85862412, E-mail: zhenghxu@sytu.edu.cn

收稿日期:2006-10-11,修回日期:2006-10-30

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 样品采集** :镇江恒顺香醋醋醅采样点温度 42℃,从发酵池距表面 10cm 处取样。样品采集后,以冰盒保持低温,尽快带回实验室, -20℃ 冻存。

**1.1.2 试剂及药品** :除特别说明外,本文所用试剂或试剂盒均为国外进口产品。

### 1.2 方法

**1.2.1 醋醅样品预处理** :取 6g 湿重醋醅样品,用 30mL 0.1 mol/L 的磷酸盐缓冲液(pH 7.0)悬浮,加入玻璃珠,以振荡器充分振荡 5min;200r/min 离心 5min,收集上清,沉淀重复洗涤 3 次。最后收取的上清液 9000r/min 高速离心 5min,弃上清,收集沉淀(菌体);收集的菌体用 5mL 0.1mol/L 的磷酸盐缓冲液(pH 7.0)悬浮,9000r/min 离心,重复洗涤 3 次,洗净的菌体悬浮在 5mL 磷酸盐缓冲液(pH 7.0)中,用移液器吹打后振荡器振荡均匀,平均分装 3 份于 2mL EP 管中, -20℃ 冻存。

**1.2.2 样品总 DNA 提取** :样品总 DNA 的提取采用 Beadbeater 机械法,按改进的 Zoetendal(1998)的方法<sup>[5]</sup>进行。其步骤是:取经过样品洗涤的一管菌体细胞 9000r/min 高速离心 5min,弃上清,沉淀中加入 1mL buffer A(10mmol/L Tris-HCl(pH 8.0),150mmol/L NaCl),混匀,转移到加有 0.3g 玻璃珠(直径 0.1mm)的螺帽管(screw tube)中,加入 150μL 苯酚,Bead beater 细胞破碎仪在最大速度击打 4min(80s × 3 times,每处理 80s,将螺帽管在冰上放置 1min);击打 4min 后,加入 110μL 10% 十二烷基硫酸钠,轻轻混合均匀后,冰上放置 10min,每 5min 轻轻颠倒摇匀;加入 150μL 氯仿:异戊醇(25:1, V/V)溶液,轻轻混匀,15000r/min 离心 10min,收集上清,加入 1/10 体积的 3mol/L 醋酸钠,用等体积酚:酚:氯仿和氯仿各抽提一次,15000r/min 离心 10min,收集上清;2 倍体积冰乙醇沉淀 2h,15000r/min 离心 15min,弃上清,沉淀真空冷冻干燥后溶于 30μL TE(10 mmol/L Tris-HCl, 1 mmol/L EDTA, pH 8.0)中, -20℃ 冻存。

**1.2.3 细菌 16S rDNA PCR 扩增**<sup>[4]</sup> :以 DNA 提取产物为模板, P0 和 P6 为引物,扩增 16S rDNA 区域,反应条件为:95℃ 预变性 5min,然后经 20 个循环(95℃ 30s,56℃ 30s,72℃ 90s),最后 72℃ 延伸 8min,结束反应。

**1.2.4 PCR 产物的回收、纯化、克隆及序列测定** :常规分子生物学操作均按照分子克隆实验指南<sup>[6]</sup>及 DNA 胶回收试剂盒(AxyPre)说明书进行。PCR 纯化产物与 pGEM-T Easy vector(Promega)经 T<sub>4</sub> DNA 连接酶连接后,转化大肠杆菌 DH10B 感受态细胞,用含氨苄青霉素的 X-Gal/IPTG/LB 平板进行蓝白斑筛选。序列测定由人类基因组南方中心完成。测序结果用 RDP 进行比对及同源性分析,并用 ARB 构建进化树。序列提交 GenBank,序列登录号为 DQ901702 - DQ901729。

## 2 结果

### 2.1 总 DNA 的抽提

总 DNA 经 0.8% 的琼脂糖凝胶电泳,分子量约为 23kb 左右,DNA 产量约为 900 ng。

### 2.2 16S rDNA 的扩增

提取的总 DNA 用引物 P0、P6 扩增细菌 16S rDNA,所得的 PCR 扩增产物用 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测,发现在 1.5 kb 左右区域获得了特异性扩增片段,符合预期的产物长度。结果如图 1 所示。

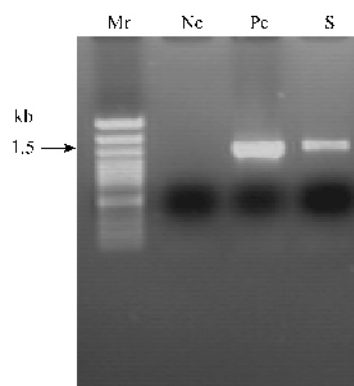


图 1 细菌 16S rDNA 的 PCR 扩增产物电泳图谱  
Mr 100bp 分子量标准(100bp ~ 3kb); Nc 阴性对照; Pc 阳性对照; S 样品

### 2.3 16S rDNA 序列分析

对细菌 16S rDNA 扩增产物进行胶回收和纯化,并将其连接到 pGEM-T Easy vector 上,转入 *E. coli* DH10B 感受态细胞中,进行蓝白斑筛选。挑取 96 个白斑进行测序,对序列分析后,划分为 16 个 OUT,每个 OUT 选择代表序列在 RDP 中进行比对,比对结果如表 1 所示。

表 1 醋醅样品 16s rDNA 序列分析结果

OTU 序号	具有最高同源性的菌株	同源序列登录号	与同源序列的相似性(%)
# 1	<i>Acetobacter pomorum</i>	AJ419835	99.9
# 2	<i>Acetobacter pasteurianus</i>	AJ419834	99.4
# 3	<i>Lactobacillus panis</i>	X94230	99.4
# 4	<i>Lactobacillus acetotolerans</i>	M58801	98.6
# 5	<i>Lactobacillus gallinarum</i>	AJ853309	99.3
# 6	<i>Lactobacillus crispatus</i>	AF243150	93.8
# 7	<i>Lactobacillus pontis</i>	X76329	98.8
# 8	<i>Staphylococcus gallinarum</i>	AY211158	100
# 9	<i>Staphylococcus kloosii</i>	DQ093351	100
# 10	<i>Enterobacteriaceae bacterium Z4076</i>	DQ288160	96.9
# 11	<i>Enterobacter</i> sp. CC1	AJ550468	98.2
# 12	<i>Pseudomonas geniculata</i>	AB021404	98.8
# 13	<i>Pseudomonas cissicola</i>	AB021399	100
# 14	<i>Gluconacetobacter intermedius</i>	AB166739	99.7
# 15	<i>Sinorhizobium</i> sp. S002	AF285962	97.7
# 16	<i>Flavobacterium</i> sp. 2.4	AJ626986	100

2.4 系统发育树的构建

将测序结果和相关种属代表菌株的 16S rDNA 序列用 ARB 构建系统进化树,其结果如图 2 所示。

3 讨论

固态开放式天然制醋发酵工业是具有我国鲜明民族特色的传统行业,其醋酸发酵是一个多菌种发酵的过程。研究人员尝试通过纯培养技术对醋醅中的微生物进行分离培养,最终只分离得到了少量乳酸菌和醋酸菌<sup>[7]</sup>。本文借助微生物分子生态学的方法,通过对醋醅样品中的细菌 16s rDNA 序列分析,初步获得了恒顺香醋醋酸发酵过程中细菌的群落信息,发现除了包括丰富的乳酸菌和醋酸菌之外,还有很多其它的微生物在发酵过程中共同存在并发挥作用,如 *Sinorhizobium*、*Enterobacter*、*Gluconacetobacter* 等。此外,乳酸菌多为厌氧菌,但是

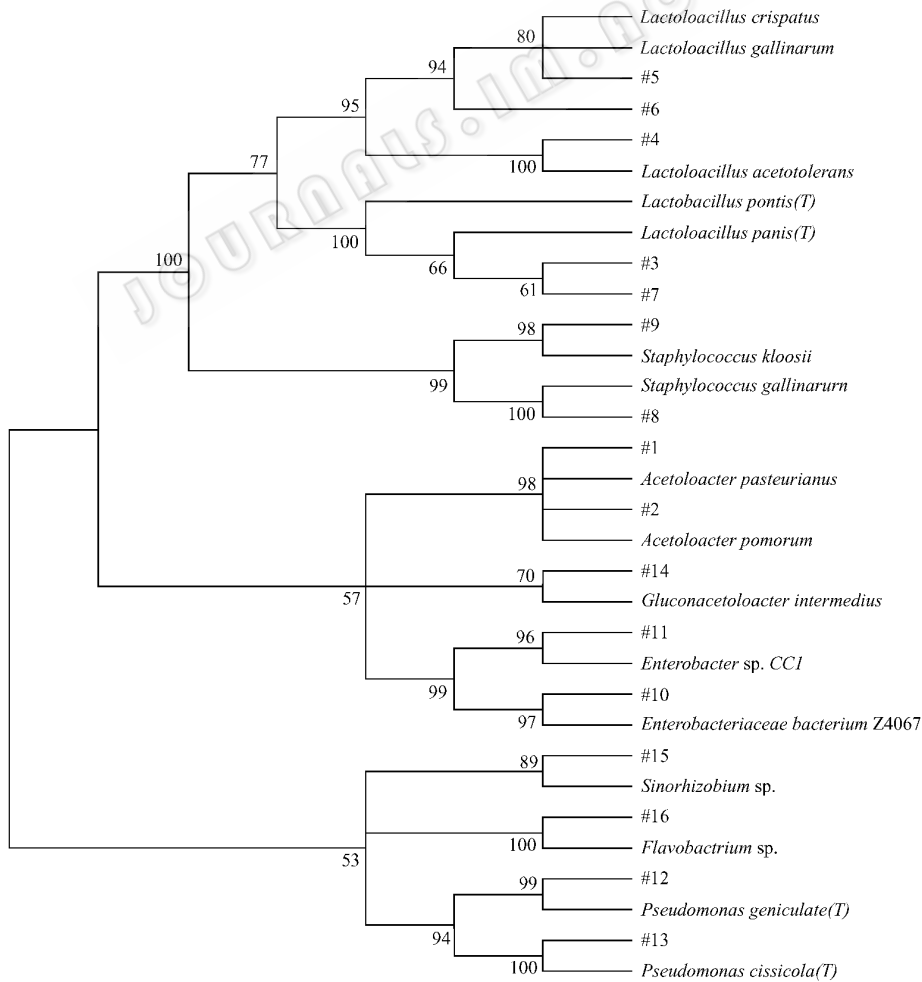


图 2 醋醅样品细菌 16S rDNA 序列系统发育树

在醋酸好氧发酵过程中存在,且丰度很高。作者推断可能和镇江恒顺香醋使用的醋酸固态分层发酵工艺有关。传统的固态分层发酵工艺与实际意义上的通风好氧发酵有所不同,该工艺中醋醅内可能是一个微氧环境,甚至有局部厌氧或痕量氧存在的可能,这可能是恒顺香醋发酵醋醅中乳酸菌偏多的主要原因之一。此外,镇江恒顺香醋中的有机酸含量非常丰富<sup>[8]</sup>,这也很可能与乳酸菌等微生物的大量存在有很大的关系。除细菌之外,包括酵母菌、霉菌等在内的真菌对醋发酵的顺利进行以及成品风味物质的产生也发挥着重要的作用。在研究了醋醅中细菌群落结构的基础上,还要进一步研究醋醅中真菌的群落结构,找出微生物群落结构和功能之间的关系,这样才能更好地揭示传统酿醋的过程

机理,从而为指导微生物群落功能的定向调控奠定基础。

### 参考文献

- [1] 雷玛莎. 中国调味品, 2000, 9: 20~22.
- [2] 成剑峰. 山西食品工业, 2002, 1: 10~12.
- [3] 包启安. 中国酿造, 2000, 108(4): 1~4.
- [4] Di Cello F, Bevivino A, Chiarini L, *et al.* Appl Environ Microbiol, 1997, 63: 4485~4493.
- [5] Zoetendal E G, Akkermans A D, De Vos W M. Appl Environ Microbiol, 1998, 64(10): 3854~3859.
- [6] 金冬雁, 黎孟枫译. 分子克隆实验指南. 北京: 中国科学出版社, 1995. pp. 404~406.
- [7] 林祖申. 中国酿造, 2005, 147(6): 1~5.
- [8] 沈志远. 食品科学, 2005, 26(8): 483~485.