

宜宾浓香型白酒酿造过程中可培养细菌的系统发育多样性

王涛^{1,2}, 赵东³, 田时平⁴, 游玲², 王松^{1,2}, 冯瑞章^{1,2}, 冯学愚², 张云¹, 崔晓龙⁴

宜宾学院,¹ 生命科学与食品工程学院,² 发酵资源与应用四川省高校重点实验室, 宜宾 644000

³ 五粮液集团技术中心, 宜宾 644000

⁴ 云南大学, 云南省微生物研究所, 昆明 650091

摘要: 【目的】为较系统地了解宜宾浓香型白酒酿造过程中可培养细菌的多样性, 得到一些潜在的微生物资源。【方法】采用改良的 NA 培养基和高氏 I 号培养基分离、去除冗余, 测定所得细菌纯培养物的 16S rRNA 基因, 进行系统发育分析。【结果】分离得到 603 株细菌, 4 株菌的序列与 GenBank 中典型菌株序列相似性低于 97%, 代表着潜在新类群; 599 株菌与 GenBank 中 34 个属、101 个种的典型菌株序列相似性大于 97%, 其中以 *Bacillus* 为绝对优势菌 (315 株), *Streptomyces* (121 株)、*Lysinibacillus* (35 株)、*Staphylococcus* (45 株) 为次优势菌, 其余各属菌株均在 10 株以下。而且有 16 个属均只检测到 1 株菌。【结论】宜宾浓香型白酒发酵过程中的细菌呈现出较为丰富的多样性和一定的稳定性。

关键词: 浓香型白酒, 细菌, 系统发育多样性, 16S rRNA 基因

中图分类号: Q939 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209 (2011) 10-1351-07

中国白酒是中国传统的酿造食品, 为世界六大蒸馏酒之一, 也是中华文明的重要载体。2009 年中国白酒工业产值约 2000 亿元人民币, 其中多粮浓香型白酒占据了我国白酒 70% 以上的产量和产值。多粮浓香型白酒的发酵是一种固态、厌氧的半自然发酵过程, 依赖于生产环境、曲药、窖泥内众多微生物的协同参与, 机理复杂。发酵过程中, 微生物的代谢产物、高分子化合物的降解产物及它们之间相互反应的产物组成了白酒的呈香呈味物质, 其种类、含量及协调的比例决定了白酒的品质。由于地域气候、生态因子和酿造历史、工艺的差异带来的酿酒微生物群落的差异, 是导致多粮浓香型白酒品质差异及形成不同地域、品牌浓香型白酒的风味特征主要

原因之一^[1-2]。

因为多粮浓香型白酒的生产过程中, 曲药的生产、发酵原料的混合、发酵分别在曲房、窖房和窖池中进行, 长期不间断的生产使上述区域形成了相对稳定的生态环境, 其中的微生物群落可能逐渐趋于稳定。宜宾为中国多粮浓香型白酒的主要产区, 近千年的酿酒历史、适宜的生态因子、相对特殊的酿酒工艺可能使其多粮浓香型白酒酿酒微生物区系存在特殊性。对宜宾多粮浓香型白酒酿酒微生物开展系统的研究, 对阐明多粮浓香型白酒生产机理、改进生产工艺、稳定或提高优质白酒产量具有重要的意义。同时, 这些微生物也是一类重要的生物资源, 具有潜在应用前景。

基金项目: 四川省科技厅支撑计划项目 (2008NZ0031, 2010NZ0029); 四川省科技厅应用基础项目 (2009JY0149); 四川省教育厅重大培育项目 (09ZZ039); 四川省属高校白酒生产技术创新团队建设计划资助; 宜宾市科技专项研究项目 (200805303, 2010ZGY016)

作者简介: 王涛 (1973 -), 男, 四川宜宾人, 副教授, 主要从事微生物生态学方面的研究。Tel: +86-831-3545069; E-mail: asdfgwt@yahoo.com.cn

收稿日期: 2011-03-26; 修回日期: 2011-04-28

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 样品采集:按宜宾白酒生产企业分布情况,选取6家规模以上多粮浓香型白酒生产企业采样。采样时间为2008年3-4月。

窖房和曲房空气:采用自然沉降法,取样平板暴露在空气中5 min。

窖泥样品:取样窖池使用年限均在20年以上。每口窖取窖壁上、中、下层各4点(4面窖壁)及窖底中央窖泥各100 g,每口窖样品单独混合。

曲药样品:为各企业自制中高温小麦大曲(使用曲)。3块以上曲药曲皮、曲中心分别取样混合。

糟醅样品:入窖糟醅、发酵过程中的糟醅(每7天取样1次,共8次)、出窖糟醅分别取样。根据每口窖内糟醅堆积情况及入窖情况多点取样,入窖糟醅和出窖糟醅分别混合。

1.1.2 培养基:采用改良牛肉膏蛋白胨培养基(NA)分离细菌、改良的高氏I号培养基分离放线菌。每1000 mL培养基含100 mL糟醅、窖泥和曲药的无菌水浸提液及50000 U制霉菌素。添加的无菌水浸提液制备方法:糟醅、窖泥、曲药各50 g混合后加入500 mL水,充分搅拌均匀,115℃灭菌30 min后无菌纱布过滤。

1.1.3 主要试剂和仪器:PCR仪为Bio-Rad公司产品,兼性厌氧培养设备为常州诺基公司的诺基HP050抽气型厌氧罐。菌株DNA提取、16S rDNA片段扩增所用的各种酶、Marker、dNTPs、Buffer等试剂为上海生物工程技术服务有限公司产品(Sangon);其余试剂均为国产分析纯。

1.2 分离及系统发育分析

1.2.1 分离:按照10倍梯度稀释的方法,每个稀释梯度涂布20个平板,30℃培养(窖泥和糟醅样品的分离平板全部遮光培养,其中1/2进行兼性厌氧培养)。定期观察分离平板,挑取单菌落划线纯化于常规NA或高氏I号斜面上。根据菌落的颜色、大小、突起特征、边缘特征、表面光滑与否和透明度等肉眼可辨的特征去除冗余。在分离过程中,在分离

平板中加入了糟醅、窖泥和曲药的水浸液,且糟醅和窖泥样品采用遮光培养,尽量模拟了白酒生产相关细菌的生活环境,保证了其尽可能地被分离到。

1.2.2 DNA提取与PCR扩增:根据文献[3]适当修改,提取菌株基因组DNA、扩增出16S rRNA基因片段。引物27f:5'-AGAGTTTGATCTGGCTCAG-3'和1541r:5'-AAGGAGGTGATC CAGCCGCA-3'^[4]。扩增产物送上海生物工程技术服务有限公司(Sangon)纯化并测序,测序长度700-900 bp,所有序列已在GenBank注册。

1.2.3 系统发育分析:所得序列用EzTaxon server 2.0^[5]在线进行相似性分析。用ClustalX按照最大同源性的原则进行比对,采用Kimura-2^[6]计算序列相似值,并用BioEdit 5.0.9进行检验;采用Mega 4.0进行系统进化树的构建、编辑与保存。对聚在一条直线的菌株,通过ClustalX比对确定其序列相似度为100%后,合并成一个类群。

2 结果和分析

2.1 酿酒细菌的分离

对分离得到的大量菌株通过表观特征去除冗余后,得到603株纯培养物,其中糟醅245株、曲房160株、窖房95株、窖泥89株、大曲14株。

2.2 系统发育分析

对603株细菌的16S rRNA基因进行测序,共得到603条有效序列,GenBank序列号位于HQ238289-HQ238935之间。经序列比对、相似性分析和系统发育分析(表1,图1)发现宜宾多粮浓香型白酒生产过程中的细菌表现出较为丰富的系统发育多样性。

603株菌中有599株与分属于35个属的103个种的典型菌(典型菌株未全部列出,部分见图1)株序列相似性大于97%,4株菌的序列与数据库中近缘类群典型菌株序列相似性低于97%,可能代表新分类单位(表1)。可能代表潜在新分类单位的4株菌中,有2株菌(分别分离自曲药、曲房空气的H7B-53、S521B-54)与同一株典型菌株(*Bacillus horneckiae* 1P01SC^T)的序列最为接近,且2株菌的16S rDNA序列相似性大于99%,说明其属于同一个

表 1 菌株的 16S rRNA 序列比对分析结果

Table 1 Results of 16S rRNA gene sequence similarity analysis

Closely related genus	Strain number of				
	Air of fermentation workshop	Pit mud	Zaopei	Chinese Qu	Air of Qu workshop
<i>Alcaligenes</i>	3	1	0	0	1
<i>Aneurinibacillus</i>	0	0	1	0	0
<i>Arthrobacter</i>	1	0	0	0	4
<i>Acinetobacter</i>	0	0	1	0	0
<i>Bacillus</i>	32	27	164	11	81
<i>Brevibacterium</i>	2	2	4	0	0
<i>Brevibacillus</i>	0	0	1	0	0
<i>Brevundimonas</i>	0	0	1	0	1
<i>Corynebacterium</i>	1	0	0	0	0
<i>Citrobacter</i>	0	0	1	0	0
<i>Delftia</i>	0	0	2	0	0
<i>Enterobacter</i>	3	0	0	0	0
<i>Enterococcus</i>	0	0	0	0	1
<i>Exiguobacterium</i>	1	0	0	0	1
<i>Kurthia</i>	0	0	0	0	1
<i>Kocuria</i>	1	1	0	0	0
<i>Leclercia</i>	1	0	0	0	0
<i>Lysinibacillus</i>	6	3	17	1	8
<i>Massilia</i>	0	1	0	0	0
<i>Microbacterium</i>	1	0	1	0	3
<i>Nocardiopsis</i>	0	1	0	0	0
<i>Providencia</i>	0	0	0	0	1
<i>Paenibacillus</i>	1	3	1	0	0
<i>Paracoccus</i>	1	0	0	0	0
<i>Pseudomonas</i>	1	0	6	0	2
<i>Rummeliibacillus</i>	0	4	4	0	0
<i>Raoultella</i>	1	0	0	0	0
<i>Rhodococcus</i>	0	0	1	0	0
<i>Serratia</i>	0	2	5	0	1
<i>Sporosarcina</i>	0	1	0	0	0
<i>Staphylococcus</i>	6	4	19	1	15
<i>Stenotrophomonas</i>	0	0	1	0	2
<i>Streptomyces</i>	32	39	13	0	37
<i>Virgibacillus</i>	0	0	1	0	0
Potential novel species	1	0	1	1	1
total	95	89	245	14	160

属或种的分类单位。分离自糟醅的 S422B-23 与数据库中 *Lysinibacillus sphaericus* C3-41^T 的序列最为相似 (相似度 95.36%)。而分离自窖房的 Z8B-40 与数据库中的 *Bacillus aryabhatai* B8W22^T 序列最为相似 (相似度 96.90%)。因此 4 株代表潜在新分类单位菌株至少可能代表 3 个潜在的新分类单位^[7]。

599 株与 GenBank 中典型菌株序列相似性大于 97% 的细菌中,以 *Bacillus* 占绝对优势 (315 株, 约占总菌数的 52.24%)。其次依次为 *Streptomyces* (121 株), *Staphylococcus* (45 株), *Lysinibacillus* (35 株), 分别占总菌数的 20.07%、7.46% 和 5.80%; 其余各属菌株均在 10 株以下, 而且有 16 个属均只检测到 1 株菌。所以, *Bacillus*、*Streptomyces*、*Lysinibacillus*、*Staphylococcus* 为本研究中宜宾多粮浓香型白酒生产过程中的优势细菌, 且优势性明显。

窖房空气分离得到的 95 株菌除 1 株可能代表潜在新分类单位外, 94 株菌分属于 17 个属; 窖泥中分离得到的 89 株菌分属于 13 个属; 糟醅中分离到的细菌出 1 株可能代表潜在新分类单位外, 244 株菌分属于 19 个属; 大曲分离出的 14 株菌分属于 3 个属, 还有 1 株代表潜在新分类单位; 曲房空气分离出的 160 株菌分属于 15 个属, 还有 1 株代表潜在新分类单位。

Bacillus、*Lysinibacillus*、*Staphylococcus* 3 个属的菌株在 5 个样点均被分离到, 该 3 属共有 395 株菌, 占到了分离菌株总数的 65.50%。同时 3 个属的菌株在每个样点均占有较高的比例 (表 2), 在曲药样品分离得到菌株全部属于该 3 个属, 在糟醅样品中该 3 个属的菌株占到了 81.63%。虽然有 18 个属的菌株仅在某 1 个样点被分离到 (表 2), 这些菌株总共只有 21 株, 仅占分离菌株总数的 3.30%, 在各样点菌株占到的比例也很低 (最高仅 7.37%, 表 2)。此外 *Streptomyces* 属的菌株在曲药中没有分离到, 但在窖房空气 (32 株) 和窖泥样品 (39 株) 中均为数量最多的菌, 在糟醅 (13 株) 和曲房空气 (37 株) 中亦有相当的数量。

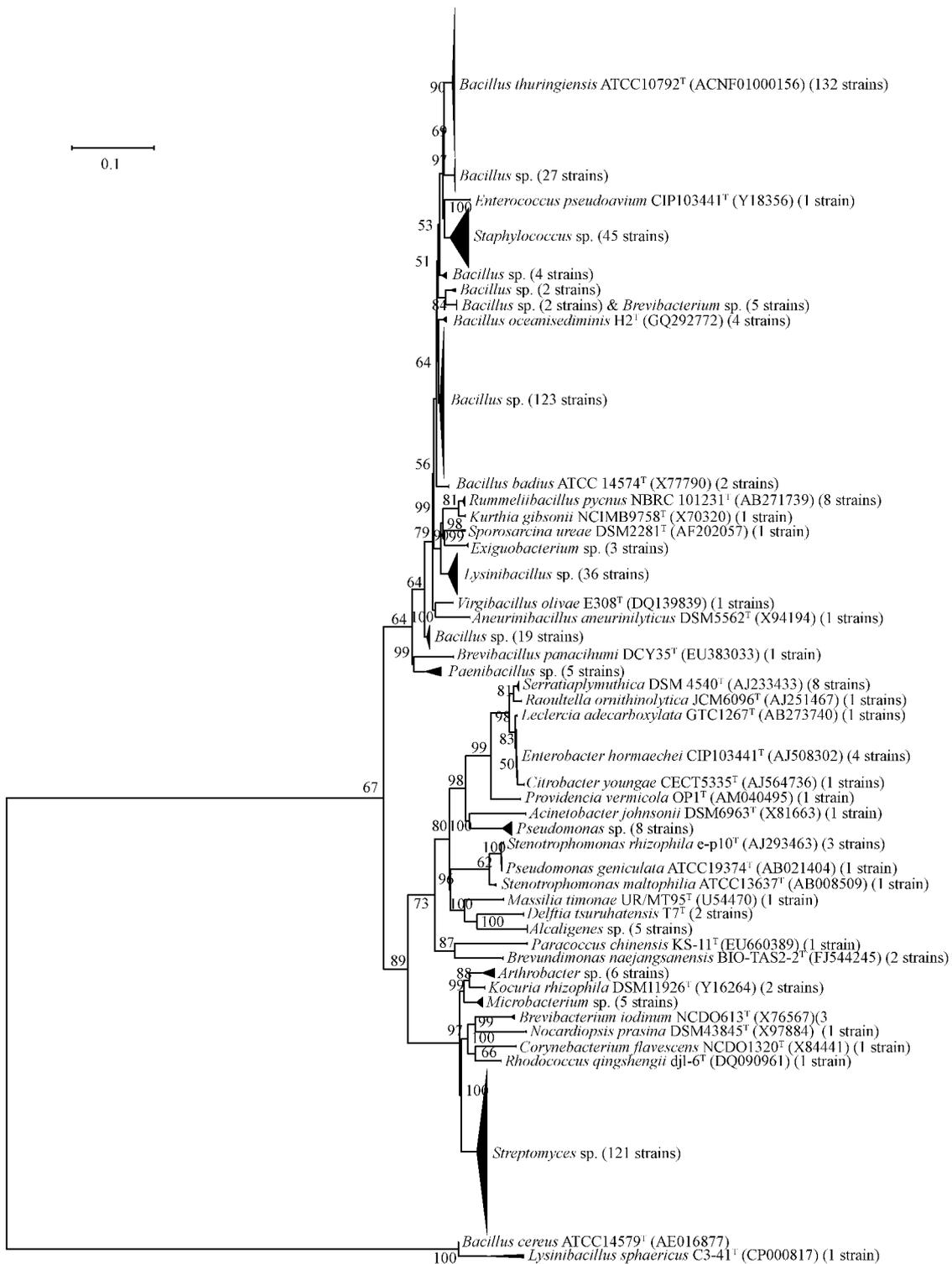


图 1 603 株细菌与相关典型菌株构建的基于 16S rRNA 基因序列的系统发育树

Fig. 1 Neighbour-joining tree based on 16S rRNA gene sequences showing relationships between the 603 isolates and reference type strains. The numbers in the nodes indicate the levels of bootstrap support based on a neighbour-joining analysis of 100 resampled datasets; only values above 50% are given. The scale bar indicates 0.1 substitutions per nucleotide position.

表2 不同样点样品的优势属、共有属及独有属的菌株数量

Table 2 The strain number of dominant genus, unique genus, mutual genus in different sampling sites

	Strain number of				
	Air of fermentation workshop	pit mud	Zaopei	Chinese Qu	Air of Qu workshop
Unique genera ^a			<i>Aneurinibacillus</i> (1)		
	<i>Corynebacterium</i> (1)		<i>Acinetobacter</i> (1)		
	<i>Enterobacter</i> (3)	<i>Massilia</i> (1)	<i>Brevibacillus</i> (1)		<i>Enterococcus</i> (1)
	<i>Leclercia</i> (1)	<i>Nocardiopsis</i> (1)	<i>Citrobacter</i> (1)	-	<i>Kurthia</i> (1)
	<i>Paracoccus</i> (1)	<i>Sporosarcina</i> (1)	<i>Delftia</i> (2)		<i>Providencia</i> (1)
	<i>Raoultella</i> (1)		<i>Rhodococcus</i> (1)		
		<i>Virgibacillus</i> (1)			
The total of strains belong to the unique genera	7	3	8	0	3
Ratio (%) ^b	7.37	3.37	3.27	0	1.88
The total of strains belonging to the dominant genus ^c	76	73	213	13	141
Ratio (%)	80.00	82.02	86.94	92.86	88.13
The total of strains belonging to the mutual genus ^d	44	34	200	13	104
Ratio (%)	46.32	38.20	81.63	92.86	65.00

a: The numbers in brackets are the numbers of strain(s) belonging to the genera; b: The denominator is the number of strains isolated from the sample spot. (The following contents of the table are the same); c: The dominant genera are *Bacillus*, *Streptomyces*, *Lysinibacillus*, *Staphylococcus*; d: The mutual genera are *Bacillus*, *Lysinibacillus*, *Staphylococcus*.

3 讨论

分离得到的 603 株菌中,除 4 株可能代表 3 个潜在的新类群外,599 株与分属于 34 个属的 101 个种的模式菌株序列相似性大于 97%。其中,*Bacillus*、*Streptomyces*、*Lysinibacillus*、*Staphylococcus* 4 个属占据绝对优势(属于该 4 属菌株达 516 株,占到了 85.72%)。*Bacillus*、*Lysinibacillus* 属的菌株均可产生抗性极强的芽孢(4 株潜在的新分类单位菌株也为产芽孢细菌),*Streptomyces* 为典型丝状、产孢放线菌,它们产生芽孢或孢子可以使其种群耐受曲药生产过程中的高温、低氧环境及糟醅发酵过程中的高酸、高乙醇、低(无)氧环境,从而使其种群得以延续。同时,尽管多粮浓香型白酒各生产单元生态环境存在较大的差异,但其优势细菌却在属一级分类水平上表现高度的一致,而且 *Bacillus*、*Staphylococcus*、*Lysinibacillus* 3 个属在不同的生产单元中都处于优势菌地位。而分离所得菌株的系统发育多样性、每个生产单元优势细菌在属一级分类单位上基本一致且以产芽孢或孢子的细菌为显著优势菌等结果,在一定程度上表明在长期不间断的浓香型白酒生产所形成的高酸、高乙醇、较高温度与湿度环境中形成了具有一定多样性和相对稳定性的细菌

群落。

从分离到的细菌数量和其分属的属一级分类单位数量来看,大曲最少,糟醅最多,这与多粮浓香型白酒生产的实际情况是吻合的。因为发酵糟醅中汇集了来自窖泥、窖房空气中部分和大曲全部的菌株,且营养丰富;而采集的大曲样品为使用曲,其生产过程中要经历一个长达 7 d 左右的高温阶段(60℃左右),这很可能是导致样品中细菌数量和多样性偏少的原因。同时,从大曲中分离到的细菌都能在糟醅和曲房中找到,这也与曲药在曲房中生产,使用于糟醅窖的实际情况是吻合的。

本研究结果与王海燕等^[2]对江苏等地和张文学^[8]等对川西北浓香型白酒糟醅细菌群落的免培养研究结果存在较大的差异。免培养研究发现川西北和江苏等地发酵糟醅中的细菌优势属均为 *Lactobacillus*,且没有检测到 *Streptomyces* 和 *Lysinibacillus*;而本研究却发现 *Bacillus* 在所有生产区域内均为为优势属,*Streptomyces* 和 *Lysinibacillus* 大量存在于发酵糟醅。我们认为主要原因可能有以下几点当中的一种或多种:①不同白酒产区的环境、气候、工艺的差异导致细菌区系存在明显差异;②研究手段的差异及纯培养技术和免培养技术自身存在的问题;③16S rDNA 序列本身存在过于保守、多操纵子等问题。

本研究中 *Bacillus* 属的细菌占据了绝对优势,而且该属细菌也是其他传统固态发酵工业中的常见细菌,如在泰国北部的传统发酵木薯食品中该属菌株占到了总菌数的一半以上^[9],也是印度、意大利等地的传统豆类发酵食品中的优势菌株^[10-11]。在5个样点均检测到了的 *Staphylococcus* 属细菌也曾多种传统发酵食品中分离到,如香肠、鱼酱等^[12-14]。但关于酿酒环境中典型丝状放线菌的报道很少。目前仅任玉茂等^[15]和栾兴社等^[16]分别报道了窖泥放线菌可改善酒质和具有分解窖泥里造成窖泥板结和老化硫化物的能力。在本研究中,在有机酸含量较高的糟醅中分离到了通常生活环境为中性偏碱的 *Streptomyces* 属的菌株,这也是首次在糟醅中分离到该属菌株。此外,Ifikhar^[17]等报道了1株 *Lysinibacillus boronitolerans* 可高产酯酶,而酯酶对于浓香型白酒中的主体呈香呈味物质—酯类的产生起着重要的作用。

尽管在分离的时候,从制作培养基和培养条件都尽量模拟了酿酒相关细菌原来的生态条件,但纯培养技术只能获得环境中极少一部分细菌^[18]。而尽管免培养手段可以提供相对更为全面的多样性信息,但其方法本身也存在一定的局限性^[19],而且研究环境中相关微生物的遗传和生理方面的信息及全面而深入的了解环境中微生物的存在情况和对环境的作用,仍必须通过纯培养手段。此次报道的603株菌,至少代表了宜宾多粮浓香型白酒生产环境中细菌的一个侧面,接下来需要采用多种手段研究其生理特征、在多粮浓香型白酒生产中扮演的角色、在白酒生产及其他领域应用的可能性。

参考文献

- [1] 郭来虎. 中国第一窖. 北京: 中国工人出版社, 1999: 2-8.
- [2] 王海燕, 张晓君, 徐岩, 赵利平. 浓香型和芝麻香型白酒酒醅中微生物菌群的研究. 酿酒科技 (*Liquor-Making Science & Technology*), 2008, 2: 86-90.
- [3] 东秀珠, 蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册. 北京: 科学出版社, 2001: 353-358.
- [4] Rainey FA, Naomi WR, Kroppenstedt RM and Stackebrandt E. The genus *Nocardiopsis* represents a phylogenetically coherent taxon and a distinct actinomycete lineage: proposal of *Nocardiopsaceae* fam. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 1996, 46: 1088-1092.
- [5] Jongsik C, Jae-Hak L, Yoonyoung J, Myungjin K, Seil K, Byung KK and Young-Woon L. EzTaxon: a web-based tool for the identification of prokaryotes based on 16S ribosomal RNA gene sequences. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2007, 57: 2259-2261.
- [6] Kimura M. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution*, 1980, 16: 111-120.
- [7] Stackebrandt E, Ebers J. Taxonomic parameters revisited: tarnished gold standard. *Microbiology Today*, 2006, 33: 152-155.
- [8] 张文学, 乔宗伟, 胡承, 王忠彦. PCR技术对浓香型白酒糟醅细菌菌群的解析, 四川大学学报(工程科学版) [*Journal of Sichuan University (Engineering Science Edition)*] 2005, 37(5): 82-87.
- [9] Panuwat C, Anchalee O, Khanungkan K, Ekachai C and Saisamorn L. Characterization of proteases of *Bacillus subtilis* strain 38 isolated from traditionally fermented soybean in Northern Thailand. *Science Asia*, 2002, 28: 241-245.
- [10] Jeyaram K, Mohendro SW, Premarani T, Ranjita DA, Selina CK, Talukdar NC, and Rohinikumar SM. Molecular identification of dominant microflora associated with 'Hawaijar' - a traditional fermented soybean (*Glycine max* (L.)) food of Manipur, India. *International Journal of Food Microbiology*, 2008, 122(3): 259-268.
- [11] Seong-Jun C, Sung-Hoon O, Pridmore RD, Marcel A. Juillerat, and Cheryl-Ho L. Purification and characterization of proteases from *Bacillus amyloliquefaciens* isolated from traditional soybean fermentation starter. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2003, 51(26): 7664-70.
- [12] Lucilla I, Giuseppe C, Carlo C. Ecology and dynamics of coagulase-negative cocci isolated from naturally fermented Italian sausages. *Systematic and Applied Microbiology*, 2006, 29, (6): 480-486.
- [13] Gounadaki AS, Skandamis PN, Drosinos EH, Nychas GJ. Microbial ecology of food contact surfaces and products of small-scale facilities producing traditional sausages. *Food Microbiology*, 2008, 25: 313-323.
- [14] Katsuya F, Masataka S, Yasuhiro F, Ken-Ichi K and Shugo W. Characterization and distribution of *Staphylococcus* sp. implicated for improvement of fish sauce odor. *Fisheries Science*, 2004, 70(5): 916-923.

- [15] 任玉茂, 戴森, 樊林, 魏敏, 尚林虎, 谢卫, 庄名扬, 侯明贞. 放线菌的分离研究及在泸州白酒生产中的应用. 酿酒科技 (*Liquor-Making Science & Technology*), 1997, 3: 13-15.
- [16] 栾兴社, 胡家济, 张华英. 窖泥兼性自养型链霉菌研究. 山东科学 (*Shandong Science*), 1991, 4 (2): 9-15.
- [17] Iftikhar A, Akira Y, Atsushi Y and Toru F. Proposal of *Lysinibacillus boronitolerans* gen. nov. sp. nov., and transfer of *Bacillus fusiformis* to *Lysinibacillus fusiformis* comb. nov. and *Bacillus sphaericus* to *Lysinibacillus sphaericus* comb. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2007, 57: 1117-1125.
- [18] Miteva VI, Scheridant PP, Brenchley JE. Phylogenetic and physiological diversity of microorganisms isolated from a deep Greenland glacier ice core. *Applied and Environmental Microbiology*, 2004, 70: 202-213.
- [19] Pearce DA, Gast CJ, Lawley B, Ellis-Evans JC. Bacterioplankton community diversity in a maritime Antarctic lake, determined by culture-dependent and culture-independent techniques. *FEMS Microbiology Ecology*, 2003, 45: 59-70.

Phylogenetic diversity of cultivable bacteria during the brewing process of the Luzhou-flavor liquor in Yibin, Sichuan province, China

Tao Wang^{1, 2*}, Dong Zhao³, Shiping Tian⁴, Ling You², Song Wang^{1, 2},
Ruizhang Feng^{1, 2}, Xueyu Feng², Yun Zhang², Xiaolong Cui⁴

¹ College of Life Science & Food Engineering, ² Key Laboratory of Fermentation Resources and Application at Universities of Sichuan Province, Yibin University, Yibin 644000, China

³ Wuliangye Group Co., Ltd., Yibin 644000, China

⁴ Yunnan Institute of Microbiology, Yunnan University, Kunming 650091, China

Abstract: [Objective] In order to better understand the diversity of cultivable bacteria during the brewing process of the Luzhou-flavor liquor in Yibin, and to collect potential microbial resources. [Method] The cultivable bacteria were isolated by using modified nutrient agar medium and Gogan-I medium, and then analyzed the 16S rRNA gene sequences of the 603 non-redundant isolates separated from the air of fermentation workshop, Pit mud, Zaopei, Chinese Qu and air of Qu workshop sampled from 6 Luzhou-flavor liquor production enterprise in Yibin. [Results] Phylogenetic analysis based on 16S rRNA gene sequences showed that 599 of them belonged to 101 species of 34 genera, and 4 isolates with <97% sequence similarities to their closely related members were presumed to be potential novel species. *Bacillus* is the most dominant genus with 315 strains; *Streptomyces*, *Staphylococcus* and *Lysinibacillus* were dominant genera, with 121, 45 and 35 strains, respectively. The number of isolates belong to the other 31 genera were less than 10 strains, furthermore, only one strain was detected in 16 genera. [Conclusion] Bacteria during the brewing process of the Luzhou-flavor liquor in Yibin present plentiful diversity and relative stability.

Keywords: Luzhou-flavor liquor, bacteria, phylogenetic diversity, 16S rRNA gene

(本文责编:王晋芳)

Supported by the Sichuan Science and Technology Planning Project (2008NZ0031)

* Corresponding author. Tel: +86-831-3545069; E-mail: asdfgt@yahoo.com.cn

Received: 26 March 2011/Revised: 28 April 2011