

华大智造DNBSEQ测序平台助力传统浓香型白酒“五粮液”窖泥中的功能菌种鉴定

白酒的酿造离不开酒窖窖泥，正是酒窖窖泥中独有的功能微生物和微生物群赋予了所酿白酒的独特风味。某研究团队从酿造五粮液的明初古窖池的窖泥中首次分离出一株可生成多种白酒有益风味成分菌株¹。该团队基于华大智造DNBSEQ测序平台完成了此菌株的全基因组测序，确定为梭状芽孢杆菌属的全新菌种(编号WLY-B-L2^T)，正式命名为“产香梭状芽孢杆菌”(Clostridium aromativorans)¹。

推荐应用：工业微生物

推荐机型：MGISEQ-2000RS, DNBSEQ-G99RS

• 数据检测准确性高

DNBSEQ技术具有低标签跳跃、低扩增错误累积的特点，为获得高质量的全基因组数据提供了保证。

• 相对较高的测序通量

MGISEQ-2000或DNBSEQ-G99拥有相对较高的测序通量，每次运行可分别产生55~1440GB或8~96Gb数据，满足大量样本的测序需求。

• 适配自动化建库设备

测序仪搭配自动化建库平台MGISP-100和MGISP-960等，在大样本量时可确保高效，准确地建库。



背景介绍

技术的革新推动了大规模平行测序(MPS)在食品微生物组学研究中的应用。与传统方法相比，MPS具有更高的灵敏度，能够识别到在样本中发挥重要作用的非优势微生物群落。根据测序技术路线的不同可以将MPS分为靶向测序技术和鸟枪法测序技术。前者以微生物的16S核糖体DNA (rDNA)为扩增或捕获目标，开展分类学和微生物群落鉴定的相关研究。而经培养富集的菌落提取DNA样本进行鸟枪法测序则是经济、高效的全基因组测序(WGS)方案，便于开展后续的比较基因组学研究^{2,3}。国内外学者利用鸟枪法宏基因组学方法对奶酪、泡菜、发酵酒、可可豆等发酵食品的微生物群落展开了系列研究²。

“白酒”是一类经粮食发酵的传统蒸馏酒，已成为我国传统文化的一个符号象征。俗话说“千年老窖万年糟，酒好须得窖池老”。浓香型白酒是我国白酒的四大基本香型之一，泥窖固态续糟发酵是浓香型白酒区别于其他白酒的重要特点，为其带来了绵甜爽净和窖香浓郁的风格特征。五粮液是我国“浓香型”白酒之大乘，其最早始于1368年(明初洪武元年)的五粮液古窖池群，活态酿造延续至今。这些窖泥为酒液酿造过程中的关键微生物群提供营养载体和介质，而正是窖泥中蕴藏的这些菌群的代谢为酒液注入了“窖香味”。相关微生物的鉴定对于破解传统浓香白酒的甘醇风味的来源具有重要意义^{4,5}。然而，由于技术手段的限制，过去我们对此类微生物的菌种功能和特征不甚了解⁶。

近日，“五粮液”团队基于华大智造独有的DNBSEQ测序技术对五粮液酿酒车间明初古窖池窖泥完成全基因组测序、分析，首次分离出一株产生多种风味成分的菌种，编号为WLY-B-L2^T，明确是一株梭状芽孢杆菌的全新菌株，并命名为产香梭状芽孢杆菌(*Clostridium aromativorans*)，这对进一步了解老窖泥中的功能微生物提供了助力，对传统白酒五粮液的高质量产量倍增、甘醇风味来源的研究都具有重要意义。

研究描述

为了阐明窖泥中的微生物如何影响浓香型五粮液的风味，“五粮液”研究团队在四川省宜宾的五粮液酿酒车间的明初古窖池窖泥中分离得到了一株厌氧、革兰氏阳性菌株，编号为WLY-B-L2^T。该团队基于华大智造的DNBSEQ测序平台完成了该菌株的全基因组测序，并通过后续分析鉴定其为一株全新的梭状芽孢杆菌，还通过进一步的生理及代谢分析，发现其能产生丁酸、戊酸乙酯、乙酸乙酯和2-戊酮等重要的风味成分，此菌株被正式命名为产香梭状芽孢杆菌(*Clostridium aromativorans*)。华大智造的DNBSEQ测序平台为食品工业微生物的鉴定和分析提供了有力的工具。

实验方法

样本收集

从五粮液酿酒车间明初501#古窖采集的窖泥样本经厌氧培养5天后，利用梯度稀释和划线等方法分离得到WLY-B-L2^T菌株，经过挑单克隆和纯化后保存，后利用上海生工的核酸试剂盒完成DNA的提取。研究中，选取近缘的*C. luticellarii* FW 431^T 菌株作为生理和化学特征的比较分析。

文库制备及测序

所提取DNA先利用通用引物对27F (5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTCAG-3')，1492R (5'-GGT TAC CTTGTT ACG ACTT-3') 完成16S rRNA基因的扩增，而后再将扩增产物连接至pEASY-T1克隆载体上，随后转染至DH5α大肠杆菌中表达，使用M13通用引物进行Sanger测序以确定该菌株的基因序列。

为了对WLY-B-L2^T进行全面的分析，该研究也同时构建了该菌株的WGS文库，并在华大智造DNBSEQ测序平台上完成全基因组的测序工作。

生信分析

16S rDNA Sanger测序序列利用MEGA(7.0版)进行系统发育树分析。根据邻接法(neighbor-joining method)，将测序序列与EzTaxon服务器上的其他近似种的基因组进行亲缘分析，共17个菌种被选出。采用interior-branch 法和 bootstrap 法来分析物种之间的分类进化距离。探讨菌株WLY-B-L2^T的16S rRNA基因序列和密切相关的物种的亲缘关系。

将WGS测序得到的序列在GeneBank上进行Blast分析。在GGDC网站上，利用Formula2计算基于基因组信息得到的DNA杂交值。利用Glimmer3.02软件完成基因注释；利用KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes)、COG (Cluster of Orthologous Groups)和GO (Gene Ontology)数据库完成基因的功能分析和核心基因预测。

样本储存	文库制备和测序	生信分析	结果分析
采集五粮液古窖窖泥，划线和梯度稀释法筛选培养，挑取单克隆，提取DNA	 DNBSEQ测序平台	MEGA; GGDC网站; Glimmer3.02; KEGG、COG和GO数据库	构建系统发育树; 基因组距离计算; 基因注释; 核心基因预测; 基因功能分析;

结果

形态观察和生化代谢特征分析

该研究团队对分离培养的菌落的形态、外观进行了观察、并与*C. luticellarii* FW 431^T对比了生长条件。结果显示该菌是严格厌氧菌，革兰氏阳性，0.5-0.7 μm宽、1.7-3.1 μm长的直形或略微卷曲形杆状细胞，单独或成对排列。菌落呈圆形，浅黄色，凸起，不透明，边缘不规则。生长条件为温度15~45°C、pH 5~8、NaCl浓度0~3%和乙醇浓度0~6%。能产生白酒中丁酸、戊酸乙酯、乙酸乙酯和2-戊酮等重要风味成分，其中乙酸乙酯和戊酸乙酯均具有典型果香味，有类似香蕉、苹果的香气，是浓香型白酒重要的骨架风味成分。

亲缘分析和基因组分析

该团队进一步进行了基因组比对分析，发现该菌株的16s rDNA序列与*C. luticellarii* FW 431^T基因组的相似度达到97.42%，而与其他梭菌型菌株的基因组相似度低于98.65%。根据Ribosomal Database Project (RDP) (<http://rdp.cme.msu.edu/classifier/classifier.jsp>)的分析，WLY-B-L2^T属于梭菌属，是一个不同于*C. luticellarii* FW431^T的新分支(图1)。

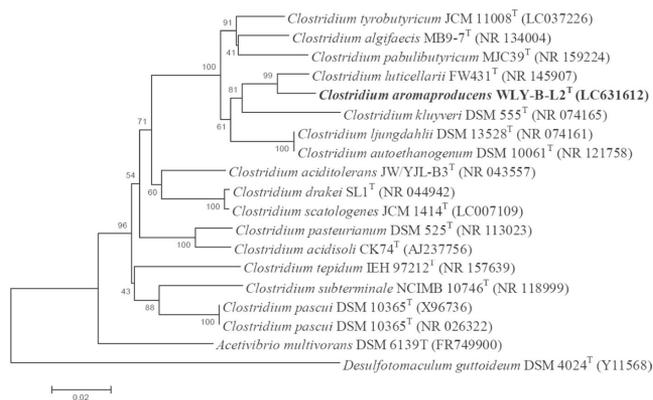


图1. WLY-B-L2^T的进化分析树。

为了深入的阐述新菌株的基因组信息和功能(图2)，WLY-B-L2^T的全基因组测序分析结果显示，G + C%为34.16 mol%，而*C. luticellarii* FW431^T为44.4 mol%，WLY-B-L2^T和*C. luticellarii* FW431^T(NR_145907)的dDDH为28.1%，低于种间距离的下限阈值，因而可以进一步证明WLY-B-L2^T菌株为一新发现的新菌种。

功能预测和代谢通路分析

进一步的核心基因功能预测分析的结果显示，WLY-B-L2^T基因组上有218个基因参与碳水化合物代谢、218个基因参与氨基酸新陈代谢、154个基因参与辅因子和维生素的代谢、159个基因参与能量代谢、87个基因参与膜转运。COG分析结果显示156个基因参与未知功能，注释到代谢的最多的COG分类为氨基酸转运和代谢(303个)，无机离子运输和代谢(172个)，辅酶运输和代谢(173个)。

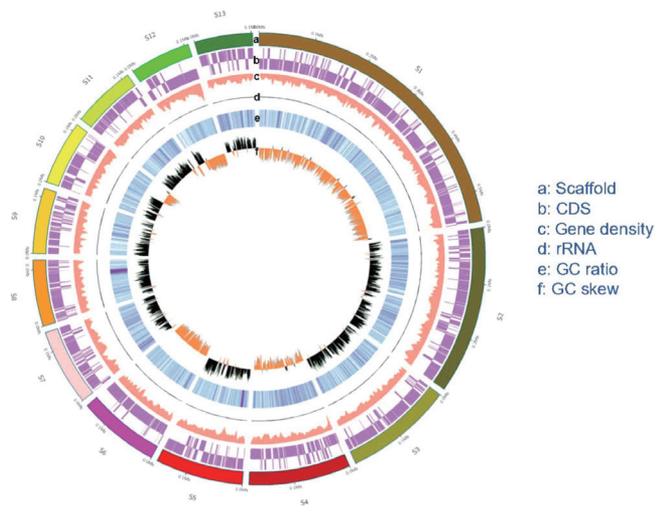


图2. 显示菌株WLY-B-L2^T的基因组图谱。上传GenBank的菌株WLY-B-L2^T的16S rRNA基因序列编号为LC631612，基因组草图的DDBJ/ENA/GenBank登录号为JAJJPB000000000。

总结

基于华大智造DNBSEQ测序平台对从窖泥分离的菌株进行全基因组测序，独有的DNBSEQ技术，搭配规则阵列(Patterned Array), cPAS (combinatorial Probe Anchor Synthesis, 联合探针锚定聚合测序法)等技术具有低标签跳跃，低错误累积的优势，更高准确性为后续获得菌株的更高质量的全基因组数据提供了保障，也为后续的功能基因研究提供了依据。

华大智造DNBSEQ测序平台为食品工业微生物鉴定提供有力工具，助力传统浓香型白酒的风味来源研究。



MGISEQ-2000RS 基因测序仪



DNBSEQ-G99RS 基因测序仪

参考文献

1. Luo, Q., Zheng, J., Zhao, D. & Liu, D., *Clostridium aromatorans* sp. nov., isolated from pit mud used for producing Wuliangye baijiu. *ANTON LEEUW INT J G* 116 739 (2023).
2. De Filippis F, Parente E, Ercolini D. Recent Past, Present, and Future of the Food Microbiome. *Annu Rev Food Sci Technol*. 2018 Mar 25;9:589–608. doi: 10.1146/annurev-food-030117-012312. Epub 2018 Jan 18. PMID: 29350561.
3. Yao Z, Zhu Y, Wu Q, Xu Y. Challenges and perspectives of quantitative microbiome profiling in food fermentations. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 2024;64(15):4995–5015. doi: 10.1080/10408398.2022.2147899. Epub 2022 Nov 22. PMID: 36412251.
4. 蔡鹏飞,邵传贞,姚庆乐, 等.窖泥在酿酒中的两个作用[J].酿酒, 2011,38(5):59–61.
5. 梁欢, 许长峰, 朱立宁, 等.浓香型白酒地域性及窖泥微生物研究进展[J].中国酿造, 2020, 39(11): 5–8.
6. 骆红波, 孙优兰, 范奇高, 等.组学技术在白酒酿造微生物中的应用进展[J].中国酿造, 2023, 42(12): 13–21.

推荐订购信息

产品类型	产品名称	产品货号
仪器	基因测序仪 MGISEQ-2000RS	900-000035-00
	基因测序仪 DNBSEQ-G99ARS	900-000608-00
	MGISP-960RS 自动化样本制备系统	900-000070-00
	MGISP-100RS 自动化样本制备系统	900-000100-00
软件	MegaBOLT 生信分析加速器 (工作站式服务器)	970-000085-00
建库试剂	MGIEasy 酶切 DNA 文库制备试剂套装 (16 RXN)	1000006987
测序试剂	MGISEQ-2000RS 高通量测序试剂套装 (FCL PE100)	1000012554
	DNBSEQ-G99RS高通量测序试剂套装 (G99 SM FCL PE150)	940-000410-00

深圳华大智造科技股份有限公司

深圳市盐田区北山工业区综合楼11栋

4000-688-114

www.mgi-tech.com

MGI-service@mgi-tech.com

股票简称：华大智造

股票代码：688114



仅供研究使用

版权声明：本手册版权属于深圳华大智造科技股份有限公司所有,未经本公司书面许可,任何其他个人或组织不得以任何形式将本手册中的各项内容进行复制拷贝、编辑或翻译为其他语言。本手册中所有商标或标识均属于深圳华大智造科技股份有限公司及其提供者所有。

版本：2024年8月版

撰稿：葛瞳瞳

责任编辑：王其伟

审稿：江遥