

浓香型白酒窖泥中两株细菌的分离鉴定

黄治国,卫春会,边名鸿,宗绪岩,罗惠波,郑若欣

(四川理工学院酿酒生物技术及应用四川省重点实验室,四川 自贡 643000)

摘要: 从泸州老窖浓香型白酒发酵窖池的窖泥样品中分离出了 2 株细菌。经菌落特征观察和镜检后,利用 Biolog 微生物自动鉴定系统对菌株进行了鉴定,结果表明,XJ-01 为 *Bacillus licheniformis*(地衣芽孢杆菌),XJ-02 为 *Bacillus*(芽孢杆菌属)。

关键词: 浓香型白酒; 窖泥; 细菌; Biolog 鉴定系统

中图分类号:TS262.31;TS261.4;TS261.1;Q939.1 文献标识码:A 文章编号:1001-9286(2012)11-0036-03

Isolation and Identification of Two Bacteria Strains from Pit Mud of Luzhou-flavor Liquor

HUANG Zhiguo, WEI Chunhui, BIAN Minghong, ZONG Xuyan, LUO Huibo and ZHENG Ruoxin

(Sichuan University of Science & Engineering, Liquor-making Biotech & Application Key Lab, Zigong, Sichuan 643000, China)

Abstract: Two bacteria strains were isolated successfully from pit mud of Luzhou-flavor liquor. After colony characteristics observation and microscopic examination, Biolog automated microbes identification system (Biolog System) was adopted to identify the two bacteria strains, and the results showed that XJ-01 bacteria was *Bacillus licheniformis* and XJ-02 bacteria was *Bacillus*.

Key words: Luzhou-flavor liquor; pit mud; bacteria; Biolog System

浓香型白酒的生产以窖泥窖池为基础,以窖泥为发酵主体物质。发酵过程是栖息在窖池窖泥中的庞大微生物区系在窖泥固、液、气三相界面的复杂物质能量代谢过程^[1]。窖泥微生物经过长期的驯化和变异发展,其种类不断丰富,慢慢形成了以己酸菌、丁酸菌为主的窖泥微生态菌群体系,其生命代谢所产生的复合窖香香气构成了浓香型白酒窖香浓郁的基础^[2]。在发酵过程中,细菌在原料淀粉质的糖化、酒精的生成和香气物质的形成等方面起着重要作用。随着发酵阶段的变化,细菌种群结构也会产生变化,因此,对窖泥中的细菌进行种属鉴定对白酒生产有着重要的指导意义。

本试验从泸州老窖浓香型白酒窖泥中分离出 2 株细菌,经纯化培养,最后利用 Biolog 自动微生物鉴定系统对分离到的菌株进行分类学鉴定。初步探讨 Biolog 鉴定系统在白酒窖泥细菌鉴定中的应用,为相关研究提供基础资料。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 样品、试剂及仪器

窖泥样品: 采自泸州老窖股份有限公司白酒生产窖池(乾隆年间开始使用的天成生作坊、窖龄 300 年左右),于窖底中心取样,迅速置于冰盒运回,4℃保藏。

主要试剂: 蛋白胨、酵母膏、琼脂粉、NaOH(分析纯)等购自成都科龙;BUG 培养基,GP2 MicroPlate、巯基乙醇酸钠等购自美国 Biolog 公司。

仪器设备: Biolog 自动微生物鉴定系统、浊度仪、电动移液器购自美国 Biolog 公司;生物显微成像系统,日本 NIKON 公司;恒温培养箱(MJ-250),上海和羽良公司;超净工作台(SW-CJ-1F),苏净集团。

1.1.2 培养基

牛肉膏蛋白胨培养基: 称取牛肉膏 2.5 g,蛋白胨 5 g,琼脂粉 12 g,NaCl 2.5 g 于 1000 mL 锥形瓶,加入 500 mL 的蒸馏水^[3],加热溶解,塞紧棉塞,牛皮纸包扎。121℃高压湿热灭菌 15 min,冷却至 45~50℃时调整 pH7.2~7.4,于超净工作台上倒平板备用。

BUG 培养基: 称取 BUG 琼脂培养基 5.7 g,加入到 100 mL 蒸馏水中,加热溶解,冷却后调整 pH 值至 7.3 左右。121℃高压湿热灭菌 15 min,冷却至 45~50℃时,于超净工作台上倒平板备用。

基金项目: 四川省科技厅应用基础项目(07JY029-026);四川理工学院引进人才项目(2007-18)。

收稿日期: 2012-06-21

作者简介: 黄治国(1978-),男,四川广安人,博士,副教授,研究方向为发酵工程,Email: hzgwww@126.com。

1.2 实验方法

1.2.1 细菌的分离纯化

在无菌条件下,取 0.5 g 窖泥,加入 50 mL 无菌水,充分摇匀,自然沉淀后取上清液,得到 10^{-2} 稀释样。然后依次制成 $10^{-3} \sim 10^{-7}$ 稀释样。吸取 $10^{-5} \sim 10^{-7}$ 菌悬液各 0.5 mL,均匀涂布于牛肉膏蛋白胨培养基平皿,28 °C 培养 48 h 后,根据菌种的生长状况,选取适当平皿,挑取单菌落,转接于另一平皿,依照此法转接 2~3 次,进行分离纯化。最后根据菌落特征及革兰氏染色镜检确认为细菌后,挑取单菌落移入斜面,培养后备用。

1.2.2 BUG 培养基培养

挑取斜面上的菌落,在滴加了巯基乙酸钠的 BUG 培养基平板上进行十字划线接种,37 °C 下恒温培养 12 h。

1.2.3 Biolog 的鉴定^[3]

在无菌条件下,用灭菌棉签从 BUG 培养基平板上挑取十字接种外周的菌落,接种于 GN/GP-IF 接种液中,使其浊度调整为 28%。用移液器接种到 GP2 MicroPlate 上,28 °C 培养 24 h、48 h、72 h 后分别用 Biolog 自动微生物鉴定系统进行鉴定。

2 结果与分析

2.1 窖泥中细菌的分离纯化

试验以泸州老窖浓香型白酒生产窖池采集的窖泥样品为对象,进行细菌的分离鉴定,成功分离出了 2 株细菌并将其分别编号为 XJ-01 和 XJ-02,都具有细菌菌落的形态特征:湿润、较光滑、较透明、较粘稠、易挑取、质地均匀等,有芽孢的菌落表面干燥皱褶。对分离纯化后的 2 株细菌进行镜检,结果见图 1、图 2。XJ-01 和 XJ-02 均以单个细胞存在,并未发现杂菌。结合纯化结果和镜检结果,确定该菌株较纯,已达到 Biolog 自动微生物鉴定系统的鉴定要求。

2.2 Biolog 自动微生物鉴定仪鉴定

将 2 株分离纯化后的菌株 XJ-01 和 XJ-02 分别接种到微平板上,37 °C 下恒温培养 24 h 后置于 Biolog 自动微生物鉴定仪上读取数据。

菌株 XJ-01 在 37 °C 恒温箱中培养 16~24 h 的鉴定结果(图 3),显示为绿色状态栏(Species ID),表示已经鉴定出了可能性相当大的菌种。系统给出的最大可能结果是 *Bacillus licheniformis* (地衣芽孢杆菌),其 PROB 值为 100%,SIM 值为 0.637, DIST 值为 5.59。

菌株 XJ-02 的鉴定板培养 16~24 h 的鉴定结果(图 4),SIM 值小于 0.5,显示“Genus ID: Bacillus”,表示给出的结果为 *Bacillus* (芽孢杆菌属),系统给出的最大可能是



图 1 XJ-01 镜检结果



图 2 XJ-02 镜检结果

Bacillus amyloliquefaciens A(解淀粉芽孢杆菌 A),其 SIM 值为 0.471, DIST 值为 7.81; 第二结果为 *Bacillus amyloliquefaciens* B(解淀粉芽孢杆菌 B),SIM 值为 0.026, DIST 值为 8.76。

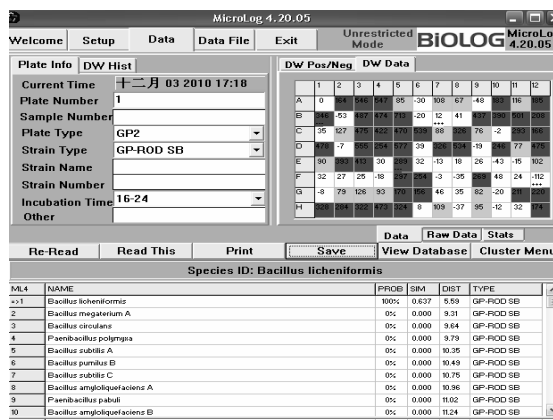


图 3 XJ-01 菌株鉴定结果

3 讨论

与传统方法相比,Biolog 自动微生物鉴定系统对细菌的鉴定操作标准化,简便、快捷,省去传统方法多种繁琐工作,如配制多种培养基,做多种生化实验及辅助实验等,因而节省了大量工作时间。纯化后的细菌在接种后 4~24 h 即可得出鉴定结果,而且准确率也高^[4-6]。

对芽孢杆菌的鉴定是本试验的研究重点,供试的

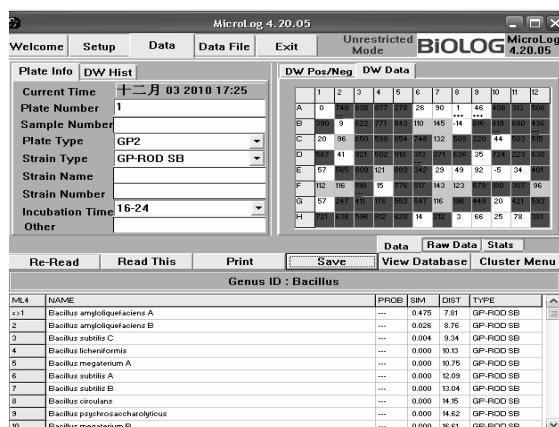


图 4 XJ-02 菌株鉴定结果

XJ-01 菌株为芽孢杆菌。芽孢杆菌易形成芽孢,其胞外易产生多糖,菌落常为粘质、蜡质等,不易制备均一的菌悬液,是 Biolog 系统最难鉴定到种水平的细菌。除了按要求严格控制培养时间,防止芽孢形成之外,在接种芽孢杆菌到 BUG 之前,用无菌棉签沾取 0.6% 的巯基乙酸钠溶液划十字于 BUG 培养基表面上,然后在划线处接种芽孢杆菌过夜培养。巯基乙酸钠可抑制细胞外多糖的产生,这样容易制备均一的菌悬液。采用这一措施后效果较好,提高了芽孢杆菌测定的准确率,测定的芽孢杆菌的符合

率较高。今后应扩大测定芽孢杆菌的范围以进一步验证。

本试验运用 Biolog 自动微生物鉴定仪对从白酒窖泥中分离纯化的 XJ-01 和 XJ-02 分别进行鉴定,结果表明,这 2 株菌分别是 *Bacillus licheniformis* (地衣芽孢杆菌)和 *Bacillus* (芽孢杆菌属)。研究表明:Biolog 自动微生物鉴定系统可用于白酒窖泥中细菌的鉴定,其鉴定速度快,操作简便,结果较准确,为白酒窖泥微生物的鉴定提供了经济、快速、有效的研究手段。

参考文献:

- [1] 罗海,刘森,田伟,等. 浓香型白酒窖池微生物生态因子的动力学分析[J]. 中国酿造,2011(7):108-112.
- [2] 邓依,唐云容,张文学.16S-23S rRNA ITS-AFLP 指纹图谱分析在白酒窖泥原核微生物多样性分析中的应用[J].酿酒科技,2010(3):46-47.
- [3] 程池,李金霞,姚栗,等. Biolog 微生物自动分析系统——细菌鉴定操作规程的研究[J].食品与发酵工业,2006,32(5):50-54.
- [4] 胡桂林,王德良,张雪峰,等.用 Biolog 微生物自动分析系统鉴定大曲中地衣芽孢杆菌的研究[J]. 酿酒,2007,34(6):32-33.
- [5] 李运,盛慧,赵荣华. Biolog 微生物鉴定系统在菌种鉴定中的应用[J].酿酒科技,2005(7):84-85.
- [6] 黄治国,熊俐,罗惠波,等. Biolog 微生物自动鉴定系统在糟醅酵母菌鉴定中的应用初探[J].四川食品与发酵,2008(1):8-10.

芝麻香型白酒技术研发项目通过鉴定

本刊讯:2012 年 10 月 10 日,中国轻工业联合会山东济南组织并主持召开了由中国食品发酵工业研究院、济南趵突泉酿酒有限责任公司共同完成的“芝麻香型白酒生产工艺规范化关键技术研发”项目技术鉴定会。

鉴定委员会专家听取了完成单位的工作报告、研究报告、应用和查新等报告,并审阅了相关资料,现场品尝样品,与会专家一致认为:首先,项目采用 PCR-DGGE 和 PLFA 等免培养分子生态学技术手段,建立了白酒微生物检测技术方法体系,对行业生产具有指导意义,为制定白酒标准化提供了技术保障;其次,通过建立白酒食品安全指标系列检测技术方法、内控限量值和标准操作规程,形成质量安全保障技术标准体系,符合行业发展方向,社会效益和经济效益明显。鉴定委员会一致同意通过鉴定,该项成果具有创新性,达到国际同类研究的先进水平。(小小)

匀酒重出江湖 10 年目标 100 亿

本刊讯:2012 年 10 月 23 日,贵州省都匀市匀酒厂生产的匀酒·观真 3500 吨产能全面恢复下沙。这是都匀市匀酒厂沉寂了 10 多年后,再次拉开了恢复大规模生产的序幕。

“匀酒”作为贵州历史上老八大名酒之一,自 1950 年面世以来,多次荣获贵州乃至全国金奖名酒的称号。但是由于历史原因,匀酒的发展曾一度沉寂。2009 年,在全省实施“工业强省”战略,特别是《贵州省白酒产业振兴计划》出台之后,黔南州和都匀市政府对原有匀酒厂实施了技改工程、产品升级、品牌多样化打造等方面的改革。2011 年,匀酒公司提出“334”战略发展规划,即 3 年打基础、3 年稳步成长、4 年快速扩张,10 年实现销售收入 100 亿元以上。截至目前已完成销售额 5000 万元。今年 9 月在贵阳举办的第二届中国(贵州)国际酒类博览会上,“匀酒”、“观真”系列品牌赢得了高度好评。

目前,黔南州和都匀市政府联合着手规划筹建集酒业生产、技术研发、酒业历史、品饮文化、生态旅游、文化旅游为一体的零污染、零排放的后工业绿色 GDP 产城一体的现代酒业生态园区——“匀酒·观真酒业生态园”。(小小)