

绿衣观音土曲中主导糖化菌的分离与鉴定

杨生智,王喆,冯春,纪添星,杨强

(劲牌有限公司,湖北 大冶 435100)

摘要: 观音土曲中的主要微生物有霉菌、酵母及少量的细菌。以本公司保存的绿衣观音土曲为出发菌,采用 PDA 培养基进行分离、纯化得到了 1 株糖化能力很强的根霉菌 G1。通过微生物形态学、分子生物学鉴定, G1 为米根霉(*Rhizopus oryzae*)。

关键词: 微生物; 观音土曲; 根霉菌; 分离; 纯化; 鉴定

中图分类号: Q93-3; TS261.1

文献标识码: B 文章编号: 1001-9286(2008)12-0073-02

Isolation, Purification and Identification of A *Rhizopus* Strain with Strong Saccharifying Power in Green-covering-guanyintuqu

YANG Sheng-zhi, WANG Zhe, FENG Chun, JI-Tian-xing and YANG Qiang

(Jin Brand Co. Ltd., Daye, Hubei 435100, China)

Abstract: Microbes in Green-covering-guanyintuqu mainly include molds, yeast and a few bacteria. Green-covering-guanyintuqu provided by Jingpai Co.Ltd. was used as starting bacteria. A *rhizopus* strain named G1 with strong saccharifying power was screened after PDA culture separation and purification. Such strain was identified as *rhizopus oryzae* by morphological and molecular biological identification.

Key words: microbe; Green-covering-guanyintuqu; *rhizopus*; isolation; purification; identification

绿衣观音土曲又名“绿衣小曲”、“绿曲”,是在湖南、湖北等地区目前普遍采用的小曲白酒曲种之一。观音土曲中的微生物主要为霉菌、酵母和少量细菌。在观音土曲上看到的菌丝基本属于霉菌,分离、纯化并鉴定观音土曲中的霉菌,是了解小曲菌系及酶系的基础,具有重要的应用价值和理论研究意义。

1 材料与方法

1.1 试验材料

土曲:本公司生产用的绿衣观音土曲。

培养基:PAD 培养基,CYA 培养基。

实验仪器:灭菌锅,上海申安医疗器械厂;电子天平,上海民桥精密科技仪器有限公司;隔水式恒温培养箱,黄石恒丰医疗器械厂。

1.2 实验方法

1.2.1 培养基的制备

马铃薯削皮,切成块煮沸 30 min,然后用纱布过滤,再加糖及琼脂,溶化后补足水至 1000 mL,121 °C 灭菌 30 min。

1.2.2 分离与筛选

从仓库采样,用四分法取样,将样品用粉碎机粉碎后,制成粉状备用。称取土曲粉 1 g,放入盛有 99 mL 无菌水并带有玻璃珠的三角瓶中,振摇 1~2 min,浸泡数

分钟后再振摇 1~2 min,使曲粉与水充分混合,制成菌悬液。用一支无菌吸管从三角瓶中吸取 1 mL 菌悬液注入盛有 9 mL 无菌水的试管中,制成 10^{-3} 稀释度的曲粉溶液,并以此类推分别制成 10^{-4} 、 10^{-5} 和 10^{-6} 稀释度的曲粉溶液。然后分别从 10^{-4} 、 10^{-5} 和 10^{-6} 稀释度的试管中吸取 1 mL 曲粉溶液放入无菌培养皿中,再加入适量的 PDA 培养基(预冷到 45~50 °C),摇匀、静置,待其凝固后将平板倒置于 30 °C 培养箱中培养。培养 12~18 h 后,用无菌小刀把平板上的单个菌落挖出,置于另一个空白 PDA 平板上,继续培养。把适量蒸熟的饭覆盖在菌丝表面,培养 48 h,米饭被软化并有甜味的菌落为糖化菌。

1.2.3 纯化

待菌落在平板上生长进入旺盛期时,用无菌接种环挑取少量孢子在平板划线,经过 2~3 次平板划线后得到初步纯化的菌落。挑取单菌落,用小刀将其挖出并移植于空白 PDA 平板上,继续培养。待该菌落生长处于旺盛期时,用接种环挑取适量气生菌丝放入盛有 100 mL 无菌水并带有玻璃珠的三角瓶内,振荡 2 min,制成均匀的孢子液,采用上述土曲粉稀释的方法,进行 10 倍递增稀释制成 10^{-2} ~ 10^{-5} 稀释度的孢子液,用无菌吸管分别吸取 1 mL 各稀释度的孢子液注入无菌培养皿中,在加入适量预冷 PDA 培养基,摇匀、静置,凝固后于 30 °C 培

收稿日期:2008-08-11

作者简介:王喆(1982-),生物化学硕士,劲牌有限公司技术中心技术员。

养。选取长有2~4个单菌落的平板,该平板上的单菌落就是该菌落的纯培养物。

1.3 鉴定方法

采用形态学鉴定,ITS1-5.8S-ITS2 区序列分析。

2 结果与分析

2.1 结果

2.1.1 分离所得菌种的形态特征

经过分离得到4株优势霉菌,其形态特征如下:

G1:菌丝粗壮,呈树枝状,先呈白色,后变为灰褐色菌丛3~5 mm,菌丛软弱,匍匐菌丝与基质面平行。孢囊梗,由匍匐菌丝生出,丛生有分枝,直径8~12 μm;孢子囊球形,直径50~100 μm,壁易消融;囊轴,球形至半球形。孢子,大小不一,球形,短椭圆形,直径3.0 μm×6.5 μm;接合孢子,不易形成;厚垣孢子匍匐菌丝中大量形成,无色至黄色,直径10~30 μm。

G2:菌落呈棉絮状,菌丝稠密,起初为白色,后期为灰褐色至黑色。孢囊梗较细长、淡褐至黄褐色,多数单生,2~3株成束,有时在孢囊梗上有囊状膨大。孢子囊球形或近球形,初为白色,后变黑色;假根极不发达,短指状或没有假根;厚垣孢子多,多为近球形。

G3:菌落起初为白色、平坦,后中间微隆、变微绿色,菌落表面有直立气生菌丝,菌丝顶端有孢子,分生孢子头近环状排列,先为白色变为蓝绿色孢子,有放射性凹沟、同心环形,反面为黄色、有放射性裂纹相对应。

G4:菌落起初为白色,菌落表面有直立气生菌丝,气生菌丝呈放射状分布,后菌丝变为灰色。

2.1.2 菌株糖化力检测结果

经过试饭^[1]检测其糖化力,发现只有G1有很强的糖化能力,其他的霉菌基本无糖化能力。

2.1.3 菌种鉴定结果

对G1经过多次纯化后,按照微生物形态学鉴定^[2~3]及ITS1-5.8S-ITS2 区序列分析对其综合鉴定,得出G1为米根霉(*Rhizopus oryzae*)。

培养条件:培养基为CYA;培养温度为25℃;培养时间为7d。

G1的宏观与显微形态见表1、图1和图2。

2.2 讨论

霉菌在培养基上的生长,不像酵母菌和细菌容易形成单菌落,挑取纯培养应尽早,在开始形成菌落时挑取,容易得到纯培养。

米根霉对培养基的要求比较高,分离所得的米根霉传2代就开始退化,不利于菌种的保藏,对于米根霉的培养基需要进一步的摸索,以延缓菌种的退化。

3 结论

把G1的ITS1-5.8S-ITS2 区序列经过PCR扩增后进行测序,对序列进行系统发育分析结果显示:菌株G1与*R.stolonifer*、*R.microsporus var. chinensis*、*R.niveus*、*R.sexualis*、*R.arrhizus*和*R.oryzae* 6个种同源性均在99.8%

表1 G1的宏观与显微形态

项目	菌落形态	
宏观形态	菌丛厚度	菌丛3~5 mm
	菌丛质地	菌丛软弱,匍匐菌丝与基质面平行
	菌丛颜色	先呈白色,后变为灰褐色
显微形态	孢囊梗	由匍匐菌丝生出,丛生有分枝,直径8~12 μm
	孢子囊	球形,直径50~100 μm,壁易消融
	囊轴	球形至半球形,平滑
	孢子	大小不一,球形,短椭圆形,直径3.0×6.5 μm
	接合孢子	不易形成
	厚垣孢子	匍匐菌丝中大量形成,无色至黄色,直径10~30 μm

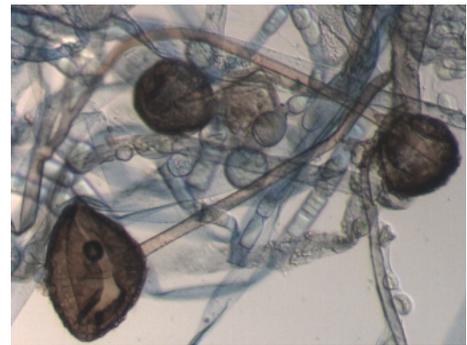
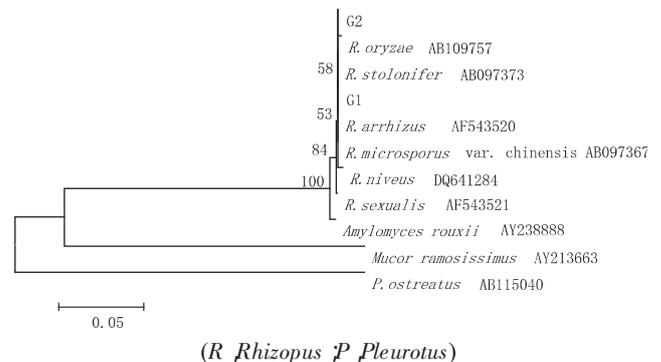


图1 G1的显微形态



0.05

(*R. Rhizopus* P *Pleurotus*)

图2 菌株G1与相关种ITS区rDNA系统发育树

以上,在进化树上的G1与米根霉聚类到一簇,进化上与其最接近的属*Amylomyces*在此序列上与其可以100%区分开来,再与形态学鉴定相结合,因此可以得出如下结论:绿衣观音土曲中的主导糖化菌G1为米根霉(*Rhizopus oryzae*)。从进化的产生时间来看,G1与*R.stolonifer* AB097373、*R.arrhizus* AF543520及*R.microsporus var. chinensis* AB097367的产生时间相同,而*R.niveus* DQ641284和*R.oryzae* AB109757的产生时间比G1要晚。G2、G3和G4可能是观音土曲中的风味菌。

参考文献:

- [1] 肖冬光,邹海晏,郭波.根霉菌试饭糖化力检测方法的研究[J].酿酒科技,1998,(5):60-63.
- [2] 《常见与常用真菌》编写组.常见与常用真菌[M].北京:科技出版社,1973.
- [3] 魏景超.真菌鉴定手册[M].上海:上海科技出版社,1979. 405-642.