

浓香型白酒产酸细菌的分离筛选

李波,唐云容,毛晓红

(贵州茅台酒厂(集团)习酒有限责任公司,贵州 习水 564622)

摘要: 采用稀释涂布法从浓香型白酒生产中分离得到 204 株细菌,经初筛、复筛、产酸实验得到产酸较强的 4 株细菌 Pe-B36、SW-B158、T-B14 和 Q₁XX-B254,经放大产酸实验得 pH 值及总酸分别为 4.63、0.73 度,4.47、0.82 度,4.63、0.86 度,4.69、0.81 度。通过 16S rDNA 序列分析,对这 4 株细菌进行了分子鉴定,研究结果表明,Pe-B36 和 *Bacillus cereus*、SW-B158 和 *Bacillus amyloliquefaciens*、T-B14 和 *Bacillus sp.*、Q₁XX-B254 和 *Bacillus cereus* 分别具有较高的相似性。产酸细菌的筛选和精确鉴定对浓香型白酒酿造环境的产酸分析及提高白酒品质具有重要的意义。

关键词: 微生物; 浓香型白酒; 产酸细菌; 分离; 鉴定

中图分类号:Q93-3;TS262.3;TS261.1

文献标识码:A

文章编号:1001-9286(2011)09-0051-03

Separation and Screening of Acidogenic Bacteria from the Production of Luzhou-flavor Liquor

LI Bo, TANG Yunrong and MAO Xiaohong

(Xijiu Co.Ltd.of Maotai Group, Xishui, Guizhou 564622, China)

Abstract: With plate dilution method, 204 bacteria strains were isolated from the production of Luzhou-flavor liquor. Through primary screening and secondary screening and acid-producing experiments, 4 high-acid-yield bacteria strains including Pe-B36, SW-B158, T-B14 and Q₁XX-B254 were obtained. By amplified acid-producing experiments, pH value and total acid content were 4.63 and 0.73 degree, 4.47 and 0.82 degree, 4.63 and 0.86 degree, and 4.69 and 0.81 degree respectively. Molecular identification of the four bacteria strains was conducted by 16S rDNA sequences analysis and the results suggested that Pe-B36 and *Bacillus cereus*, SW-B158 and *Bacillus amyloliquefaciens*, T-B14 and *Bacillus sp.*, and Q₁XX-B254 and *Bacillus cereus* had high similarities respectively. The separation and accurate identification of acidogenic bacteria is of great significance in the analysis of acid production in liquor-making environment of Luzhou-flavor liquor and in the improvement of liquor quality.

Key words: microbes; Luzhou-flavor liquor; acidogenic bacteria; isolation; identification

酸是浓香型白酒生产过程中的重要物质,其对生产过程的设备、窖泥、用曲、微生物生长、酶及生化反应等均有影响,并且酸类物质是形成酯(香)的主要前驱物质,白酒生产中产生的酸是形成酒中芳香组分的基础物质^[1]。不同的酸与醇在酶的作用下,生成不同的酯,同时酸本身在酒中还起重要的调味作用,可消除酒的苦味,是新酒老熟的有效催化剂。浓香型白酒中酸的含量与酒质密切相关,酸类是白酒中重要的呈味物质,占浓香型白酒微量芳香成分的第二位,占成分总量的 14%~16%^[2]。

白酒中的酸类物质主要由有机酸组成,其是赋予酒体香气的重要成分。同酒中的四大酯相对应,己酸、乙酸、乳酸与丁酸的生成尤为重要,它们主要是由相应的细菌产生的,研究已表明,己酸菌与丁酸菌同属梭状芽孢杆菌^[2-3]。随着酿酒向高效高品质趋势发展,高产酸优质细菌的选育和应用及其分类鉴定具有重要意义。高产酸菌的筛选对发酵剂的研究具有指导作用。目前,国内外

对酿酒环境产酸菌菌株的选育和产酸机理、产酸优良菌种的应用、产酸菌的分类鉴定及性能等方面已经做了大量的研究工作,但大部分都是针对己酸菌,对产酸细菌的筛选研究报道较少。

1 材料与方法

1.1 样品

本公司夏季生产中的大曲、酒醅、窖泥和环境。

对照菌株为实验室保藏的高产酸菌株醋酸菌 A-S1,于试管斜面冷藏保存。

1.2 试剂与设备

1.6%溴甲酚紫乙醇溶液,20%的葡萄糖溶液;U-NIQ-10 柱式细菌基因组 DNA 抽提试剂盒,购自上海生工生物工程技术有限公司;2×Taq PCR MasterMix,购自北京天根生化科技有限公司;PCR 扩增引物,购自上海生工生物工程技术有限公司。

超净工作台,电热恒温培养箱,显微镜,压力灭菌锅等。

1.3 培养基

1.3.1 葡萄糖胰蛋白胨琼脂培养基

葡萄糖 5 g,胰蛋白胨 10 g,牛肉膏 5 g,NaCl 5 g,琼脂 20 g,pH 7.2~7.4,自来水 1000 mL,121 °C灭菌 20 min。

1.3.2 牛肉膏蛋白胨培养基

牛肉膏 3 g,蛋白胨 10 g,NaCl 5 g,琼脂 20 g,pH 7.0~7.2,水 1000 mL,121 °C灭菌 20 min。

1.3.3 蛋白胨水培养基

蛋白胨 10 g,NaCl 5 g,水 1000 mL,121 °C灭菌 20 min。

1.3.4 葡萄糖蛋白胨水培养基

蛋白胨 5 g,NaCl 5 g,葡萄糖 5 g,水 1000 mL,pH 7.0~7.2,121 °C灭菌 20 min。

1.4 方法

1.4.1 细菌的分离

采用稀释涂布法分离菌株^[4]。37 °C培养 1~2 d,以菌落外观形态为主,配合菌体形态,观察计数,2~3次纯化后接入斜面(牛肉膏蛋白胨培养基),置于冰箱 4 °C保存。

1.4.2 产酸细菌的筛选

1.4.2.1 细菌糖发酵产酸初筛^[5]

采用蛋白胨水培养基 1000 mL,加入 1.6%溴甲酚紫乙醇溶液 2 mL,调 pH 7.6,121 °C灭菌 20 min。另配 20%的葡萄糖溶液,121 °C灭菌 30 min。灭菌后,每管以无菌操作分别加入 20%的葡萄糖溶液 0.5 mL(按每 10 mL培养基中加入 20%的葡萄糖溶液 0.5 mL,则成 1%的浓度)。有些细菌能分解某种糖产生有机酸(如乳酸、醋酸、丙酸等),当发酵产酸时,溴甲酚紫指示剂可由紫色(pH6.8)变为黄色(pH5.2)。

接种完的试管和不接种的空白试管均置于 37 °C培养 24~48 h,观察各试管颜色变化。根据颜色的变化程度进行初筛,将试管中颜色较黄的菌株作为产酸较好的初筛菌株,用 pH 计测定其发酵产物 pH 值,并进行下一步的复筛实验。

1.4.2.2 细菌发酵产酸复筛

将上述初筛菌株于液体试管培养基中富集后,分别接种于葡萄糖蛋白胨水培养基中,接种量为 10^6 cells/mL,每瓶培养基 100 mL,每株菌设 3 个重复,置 37 °C培养 4 d,用滴定法测定其总酸。本实验采用实验室保藏菌种醋酸菌 AS-1 作为对照。

产酸量的测定:按照国标 GB/T 10345—2007《白酒分析方法》7.1 指示剂法^[6],采用氢氧化钠标准溶液滴定法进行总酸测定。具体方法为:吸取三角瓶中培养液 20 mL,滴加 2 滴酚酞指示剂,用 0.1 mol/L NaOH 标准溶

液滴定至微红色且 10 s 不褪色,记录消耗的 NaOH 标准溶液量。由此来计算培养液中细菌产生的总酸含量。总酸定义为:100 mL 液体样品滴定消耗氢氧化钠的毫摩尔数,以度表示。

1.4.3 产酸细菌的分子鉴定^[7]

1.4.3.1 总基因组 DNA 提取

收集过夜培养的细胞,用裂解液(100 mmol/L Tris-Cl,5 mmol/L EDTA,500 mmol/L NaCl,1% SDS,pH 7.5)重悬,在 -20 °C 反复冻融 3 次后,65 °C 处理样品 30 min 再 4 °C 下以 12000 r/min 离心 10 min,收集上清液即得到释放的 DNA。利用试剂盒中的 DNA 特异性吸附柱对基因组进行漂洗、洗脱、收集。DNA 置于 -20 °C 保存。

1.4.3.2 16S rDNA 片段扩增及测序

用上游引物 27f (5'-AGAGTTTGATCCTGGCT-CAG-3') 和下游引物 1492r (5'-GGTTACCTGTTC-GACTT-3') 进行 16S rDNA 全长扩增。反应体系(25 μ L)为:模板 DNA 2 μ L,引物 27f(20 μ mol/L)和 1492r(20 μ mol/L)各 0.5 μ L,2 \times Taq PCR MasterMix 12.5 μ L,ddH₂O 补足 25 μ L。PCR 程序如下:94 °C 预变性 5 min;94 °C 变性 1 min,55 °C 退火 1 min,72 °C 延伸 2 min,共循环 30 次;最后 72 °C 延伸 10 min,4 °C 保存。PCR 产物纯化后测序,测序由上海生工生物工程技术有限公司完成。

1.4.3.3 系统发育分析

用 16S rDNA 序列的测序结果在 GenBank 数据库中进行同源性序列搜索,以比较分离菌株与已知细菌相应序列的相似性,获得产酸细菌的分子鉴定结果。

2 结果与讨论

2.1 细菌纯菌株分离结果

从夏季样品(大曲、酒醅、窖泥和环境)中分离得到优势和特征细菌 204 株,作为筛选菌种。由于菌株数量较大,接下来则根据产酸细菌的特征对分离得到的菌株进行逐步筛选。

2.2 细菌糖发酵产酸初筛

根据试管中指示剂颜色变化程度,将颜色较黄、产酸较强的 21 株菌作为目标菌株,并用 pH 计测定其 pH 值,结果见表 1。

从表 1 可以看出,大部分产酸菌发酵产物 pH 值在 5 以下,产酸较好,选取产酸能力较强的 4 株细菌:LDB-B28J、Q-B36、Q₁XX-B254、Q-B64,将其作为复筛菌株。

2.3 细菌发酵产酸复筛

产酸细菌菌株经液体扩大培养后,其产酸结果见表 2(平行样品结果取平均值)。

表1 初筛产酸细菌发酵物pH值测定

菌株	pH	菌株	pH
Pe-B6	4.44	SW-B158	4.40
LDB-B28J	4.28	JN-B79	4.40
LDD-B20	4.48	Q0-B128J	4.44
Q-B81	4.48	XSP-B7	4.48
Q-B36	4.24	T-B14	4.43
Q ₁ XX-B254	4.19	Q-B68	4.47
Q-B64	4.34	Pe-B36	4.78
Pe-B13	4.79	Q-B20	4.76
XDP-B34J	5.50	LDD-B59	5.93
LDD-B38	5.88	XDD-B79	5.97
XSP-B4	5.98		

表2 细菌发酵产酸的pH值和总酸测定

菌株	总酸(度)	pH
Pe-B36	0.73	4.75
SW-B158	0.82	4.47
T-B14	0.86	4.60
Q ₁ XX-B254	0.81	4.45
A-S1	1.44	4.03

从表2可看出,筛选出的4株产酸细菌总酸度在0.73~0.86之间,其中来自土壤中的细菌T-B14和来自大曲中的细菌Q₁XX-B254的产酸能力较强,两者的酸度和pH值分别达0.86、4.60和0.81、4.45,但与对照菌株醋酸菌A-S1相比,产酸能力还不是很高。

2.4 分子鉴定结果

2.4.1 DNA提取和PCR扩增

以EF4和EF3为引物通过酵母菌特异性PCR反应扩增得到16S rDNA序列,扩增产生的DNA片段为单一条带,大小长度约为1500 bp,产物经纯化后送上海生工测序,结果见图1。

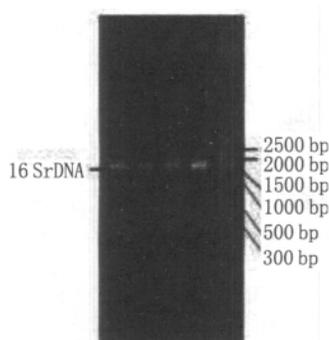


图1 4株细菌的16S rDNA电泳图

2.4.2 16S rDNA序列相似性

测定4株浓香型白酒细菌16S rDNA的序列约1500 bp,测得序列向日本DDBJ数据库提交,将测序结果在GenBank核酸序列数据库中进行同源性序列搜索,检索结果见表3。结果表明,4株浓香型白酒产酸细菌与

GenBank数据库中已知细菌的16S rDNA序列具有较高的相似性($\geq 98\%$),可以判断为同种。

表3 4株细菌的16S rDNA序列相似性分析

编号	登录号	相似菌株	相似度(%)
P-B36	AB523742	<i>Bacillus cereus</i>	99
SW-B158	AB523743	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	99
T-B14	AB523741	<i>Bacillus sp.</i>	98
Q ₁ XX-B254	AB523744	<i>Bacillus cereus</i>	100

由分子鉴定结果可以看出,4株产酸细菌均为芽孢杆菌属;并从中可知,浓香型白酒酿造环境的主要产酸来源为芽孢杆菌,与其他酒厂情况一致。

3 结论

通过对浓香型白酒酿造环境中产酸细菌的分离可知,浓香型白酒酿造环境中的产酸细菌分布范围较广,数量较多,可见酿造环境对白酒质量有着不容忽视的影响。结合分子生物学的方法对较强产酸细菌进行分类鉴定,研究发现:Pe-B36与*Bacillus cereus*的相似性为99%,SW-B158与*Bacillus amyloliquefaciens*的相似性为99%,T-B14与*Bacillus sp.*的相似性为98%,Q₁XX-B254与*Bacillus cereus*的相似性为100%。表明,芽孢杆菌属在产酸细菌中占有主导地位,此研究结果可为浓香型白酒产酸细菌的进一步研究提供依据,对浓香型白酒酿造环境中优质产酸细菌的选育具有重要的指导意义。

根据发酵产酸实验可以得出,浓香型白酒酿造环境中,产酸细菌种类和数量均较为丰富,约10%的细菌具有较好的产酸能力。其中,LDB-B28J、Q-B36、Q₁XX-B254和Q-B64具有比较强的产酸能力,T-B14的酸度最高,为0.86。Q₁XX-B254的pH值最低,为4.45。

参考文献:

- [1] 卜宇宏.离子色谱法测定浓香型白酒中有机酸含量[J].酿酒,2009,36(5):56-57.
- [2] 周广景.谈谈白酒中的酸[J].山东食品发酵,2005(1):46-50.
- [3] 徐立新,徐开成,王春梅.产酸菌的分离纯化[J].酿酒科技,2001(5):35-36.
- [4] 周德庆.微生物学实验手册[M].上海:上海科学技术出版社,1986.
- [5] 沈萍,陈向东.微生物学实验[M].4版.北京:高等教育出版社,2000.
- [6] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局,中国国家标准化管理委员会.GB/T 10345-2007 白酒分析方法[S].北京:中国标准出版社,2007.
- [7] 胡佳,邓斌,张文学,等.浓香型白酒曲药中细菌组成及系统学分析[J].酿酒科技,2007(5):17-19.