

小曲中霉菌的分离纯化鉴定

吴雪梅

(广东九江酒厂有限公司, 广东 佛山 528203)

摘要: 小曲中的微生物主要有霉菌、酵母以及少量的细菌,在小曲上能看到的菌丝基本上都属于霉菌。以广东省九江酒厂有限公司提供的小曲为出发菌,采用土豆汁培养基进行纯培养,选取长有 2~4 个单菌落的平板进行分离纯化,制成纯培养菌。通过菌落特征、形态、制片标本和生理生化试验对纯培养菌进行鉴定。共分离出根霉菌株 9 株,经鉴定,其中根霉属 4 株,毛霉属 1 株,曲霉属 3 株,青霉属 1 株。(小雨)

关键词: 小曲; 霉菌; 分离; 纯化; 鉴定

中图分类号: TS261.1; Q93-33; TQ925.7

文献标识码: A

文章编号: 1001-9286(2004)06-0033-02

Separation, Purification and Accreditation of Mold in Xiaoqu

WU Xue-mei

(Guangdong Jiujiang Distillery Co. Ltd., Foshan, Guangdong 528203, China)

Abstract: Microbes in xiaoqu mainly includes mold, microzyme and small quantity of bacteria, the visible mycelium on xiaoqu almost belongs to mold. Xiaoqu provided by Guangdong Jiujiang Distillery was used as startup bacteria for pure culture by potato juice culture medium, then 2~4 single colony plates were selected for separation and purification to produce pure culture bacteria. Through the accreditation of the culture bacteria (accreditation methods covered colony characteristics, form, tablet samples and biochemical test), nine *rhizopus* strains were separated including four *rhizopus* strains, one *mucor* strains, three *aspergillus* strains and one *penicillium* strain. (Tran. by YUE Yang)

Key words: xiaoqu; mold; separation; purification; accreditation

小曲白酒是我国白酒的一大类产品,其产量约占全国白酒总产量的六分之一^[1]。小曲是小曲白酒的糖化发酵剂,其培养和保存及应用方法是我国劳动人民智慧和经验的结晶,至今仍有其理论价值和实用价值。

小曲中的微生物主要有霉菌、酵母以及少量的细菌,在小曲上看到的菌丝基本上都属于霉菌,霉菌可以说是小曲的大户。分离纯化并鉴定小曲霉菌,是了解小曲菌系及酶系的基础,具有重要意义。

分离是纯化的准备,而鉴定时必须以菌种纯培养为样品,才能作菌种鉴定,因而菌种纯化很关键。现时科研单位多采用显微技术作单细胞分离以获得纯培养,但在企业单位并不具备这样的实验条件。利用普通的实验器材,采用简单的试验方法,同样能获得所需菌种的纯培养。

1 材料和方法

1.1 试验材料

广东省九江酒厂有限公司提供的小曲。

1.2 培养基

土豆培养基(PDA):土豆汁 1000 ml,葡萄糖 20 g,琼脂 20 g,自然 pH。土豆汁的制备:取 200 g 去皮土豆,切成小块,置于 1000 ml 自来水中煮,煮沸 0.5 h 后,以纱布过滤,用自来水补至 1000 ml。

1.3 抑菌剂

去氧胆酸钠 300 mg/L(抑制霉菌菌丝体的蔓延)。

1.4 分离方法

从饼仓采样,用四分法取样,把样品用粉碎机粉碎,制成小曲

种粉备用。称取小曲种粉 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,使种粉与水充分混合,将菌分散。用一支 1 ml 无菌吸管从三角瓶中吸取 1 ml 混浊液注入盛有 9 ml 无菌水的试管中,以此类推,制成 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} 各种稀释度的种粉溶液。用 1 ml 无菌吸管分别从 10^{-4} , 10^{-5} 稀释度的试管中吸取 1 ml 放入无菌培养皿中,再注入 45~50 ℃ 适量的 PDA,摇匀、静置,使其凝固后把平板倒置于 30 ℃ 培养箱中培养。培养 12~18 h 后,用小刀把平板上的单个菌落挖出,置于另一空白 PDA 平板上,继续培养。

1.5 纯化方法

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作平板划线,经 2~3 次平板划线后该菌已得到初步纯化。从培养十几小时的划线平板上选取单菌落,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,振摇 2 min,制成均匀的孢子液,采用小曲种粉稀释的方法,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,再倾注 50 ℃ 左右的适量 PDA 培养基,摇匀,静置,凝固后倒置于 30 ℃ 下培养。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的纯培养。

1.6 菌种保存及鉴定方法

1.6.1 菌种保存

经一系列的分离纯化后得到所需菌种的纯培养,为了做好菌种鉴定及将来作进一步的生理及产物试验,对该菌作保存很有必

收稿日期:2004-04-02; 修回日期:2004-07-01

作者简介:吴雪梅(1976-),女,广东南海人,助理工程师,从事微生物研究工作。

要。从长有2~4个单菌落的平板上选定一个单菌落,用无菌接种针挑取少量孢子,接种于PDA试管斜面上,在30℃培养40~48h后,用牛皮纸、棉绳包扎好放入铝盒储存于5℃的冰箱中。每种菌保存3支试管,每月继代一次。

1.6.2 鉴定方法

1.6.2.1 平板培养基上菌落特征的鉴定:用肉眼及放大镜观察下列各项:①生长速率;②菌落颜色及变化;③菌落背面的颜色及其变化;④培养基颜色及其变化;⑤表面结构;⑥气味。

1.6.2.2 载玻片培养基上的形态鉴定^[2]:用低倍镜或中倍显微镜检查下面各项:①基内菌丝的特点:颜色,是否分节,(如有)特殊构造的特点;②发生子实结构阶段;③成熟子实器官的特性及排列;④成熟的子实器官或子实体的颜色、大小和形状。

1.6.2.3 制片标本鉴定:①子实器官的详细构造;②孢子颜色、形状、分隔、表面、大小。

1.6.2.4 生理生化试验鉴定:目前霉菌鉴定以形态为主要依据,但对少数形态十分相似而难于区分的种,也会使用简单的生理试验加以区分,如温度试验等。

2 结果与讨论

2.1 结果^[3]

2.1.1 分离所得菌株的形态特征

经分离所得9株霉菌的形态特征如下:

1号在PDA培养基上呈棉絮状,后变灰褐色至黑色。孢囊梗光滑、粗短、浅褐至黄褐色,2~5株成束,较少单生;孢子囊黄色至黑色,球形或近球形;假根短小、手指状、不发达;厚垣孢子较多,为球形、椭圆形。

2号在PDA培养基上呈棉絮状,菌丝稠密,起初白色,老后灰褐色至黑色。孢囊梗较细长、淡褐至黄褐色,多数单生,较少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。

3号在PDA培养基上呈稠密的棉絮状,先白色后变灰黄至褐灰色。孢囊梗灰褐至暗褐色,光滑,2~5株成束。孢子囊球形或椭圆形,浅褐色;囊托楔形,大而明显;假根发达,呈根状,褐色;一般无厚垣孢子,有时有少量。

4号在PDA培养基上呈疏松至稠密的絮状,先白色后变黄白色至灰色。孢囊梗褐色、光滑,2~4株成束,较少单生,有时膨大成分枝。孢子囊球形或近球形,初为白色,老后为褐色;囊托楔形;假根有或无,若有假根,假根发达,根状,褐色,厚垣孢子极多,形状大小不一致。

5号在PDA培养基上呈絮状,黄色,菌丛矮。孢囊梗呈短的稀疏的假轴状分枝,产生2~3个孢子囊。孢子囊黄色至黄褐色,球形或长圆形。孢囊孢子椭圆形、拟椭圆形。厚垣孢子数量甚多,大小不一,黄色至褐色。

6号在PDA培养基上菌落初为白色、平坦,后中心微隆、变黄色,再变为棕黑色,菌落表面呈颗粒状,有放射性凹沟、有同心环形,反面为黄至桔黄色、有放射性裂纹,表面的凹沟与反面裂纹相对应。菌丝有隔,足细胞膨大不明显,顶囊明显膨大、多呈球形,表面生辐射状小梗,小梗顶端分生孢子串生。

7号在PDA培养基上菌落初为白色,后变青黄色、黄色,接着逐渐变为黄绿色、褐绿色,中心微隆,表面呈颗粒状,靠近中心处有放射性凹沟,有同心环形,反面为黄色。菌丝有隔,表面较粗糙,足细胞膨大不明显,顶囊膨大明显,呈烧瓶形,顶囊上长双层小梗,孢子囊、梗均为褐色。

8号在PDA培养基上菌落初为黄色,后变黄褐色,分生孢子

表1

分离所得菌株理化结果

编号	糖化力 (%)	液化力 (u/g)	发酵力 (%)	脂肪酶活 (u/g)	生长 温度
1号	16.96	2.66	22.21	12.83	45℃仍可生长
2号	12.61	2.16	20.19	12.23	37~40℃仍可生长
3号	1.93	<1	<1	128.50	37℃不能生长
4号	1.63	<1	<1	104.50	37~40℃仍可生长
5号	20.15	22.53	21.60	8.00	37~40℃仍可生长

注:曲霉及青霉在小曲中所占比例极少,未做生理、生化试验。

头放射形,顶囊球形或瓶形,小梗一般单层。

9号在PDA培养基上菌落初为白色,后变绿色,最后变为褐绿色,菌落表面呈粉粒状,有皱褶,反面为绿色,靠近中心处有时有裂纹。菌丝有隔,顶囊膨大不明显,顶囊2/3生小梗,小梗顶端分生孢子串。

2.1.2 分离所得菌株生理、生化试验(结果见表1)

2.1.3 分离所得菌株鉴定结果

经过多次分离试验后,从小曲中分纯并按照《常见与常用真菌》鉴定出霉菌9株,编号为1~9号,结果如下:

1号为毛霉目毛霉科根霉属中的华根霉(*Rhizopus chinensis* saito)。

2号为毛霉目毛霉科根霉属中的少根根霉(*Rhizopus arrhizos* Fischer)。

3号为毛霉目毛霉科根霉属中的黑根霉(*Rhizopus nigricans* Ehrenberg)。

4号为毛霉目毛霉科根霉属中的米根霉(*Rhizopus oryzae* Went et Prinsen Geerlings)。

5号为毛霉目毛霉科毛霉属中的鲁毛霉[*Mucor rouxianus* (Calmette)Wehmer]。

6号为丛梗孢目丛梗孢科曲霉属中的黑曲霉(*ASP. niger* Van Tlegheem)。

7号为丛梗孢目丛梗孢科曲霉属中的黄曲霉(*ASP. flavus* Link)。

8号为丛梗孢目丛梗孢科曲霉属中的米曲霉(*ASP. oryzae* Cohn)。

9号为丛梗孢目丛梗孢科青霉属中的桔青霉(*Penicillium citrinum* Thom)。

2.2 讨论

2.2.1 由于霉菌菌丝在PDA平板上生长蔓延速度快,除加入300mg/L去氧胆酸钠作抑制剂外,还必须做到早分离。纯化时作多次划线、移植,并采用稀释孢子液培养法,是霉菌得到纯培养的有力保证。

2.2.2 华根霉与少根根霉在PDA平板上的菌落均呈棉絮状,初为白色,后变为灰褐至黑色,菌落形态很相似。通过载片培养,华根霉假根呈手指状、短小,孢囊梗较短的特征与少根根霉有明显区别,易于分辨。

2.2.3 黑根霉和米根霉在PDA平板上的菌落呈絮状,起初白色,后变黄白色至灰黑色,载片培养及制片观察也相似。黑根霉不耐高温,37℃便不能生长,而米根霉在37~40℃也能生长。设定培养温度为38℃时,米根霉仍可生长,黑根霉未见生长。

3 结论

3.1 根霉及毛霉的特点是蔓延繁殖的,不能定形菌落,常易与其他霉菌混杂生长在一起,所以分离时应注意下列几点:

3.1.1 稀释度要大,使每一平板培养基面上只有数个菌落;

3.1.2 及早移植,一般培养12h后便须注意;

3.1.3 由于生长时菌丝蔓延连成一片,不易挑取单菌落,在培养基中添加300mg/L的去氧胆酸钠,可以防止蔓延。

(下转第36页)

表 3

酵母量变化对出酒率的影响

(%)

项目	糖化率	发酵率	生长情况
15 %GQ*+土曲	26.8	34.7	曲表外被绿色棒曲霉孢子, 裂口自然, 泡度好, 断面为淡黄色, 无黑心现象。
30 %GQ*+土曲	30.2	34.4	曲表外被绿色棒曲霉孢子, 裂口自然, 泡度好, 断面为淡黄色, 无黑心现象。
50 %GQ*+土曲	21.5	31.9	曲表外被绿色棒曲霉孢子, 裂口自然, 泡度好, 断面为淡黄色, 无黑心现象。
0.1 %硫酸铜+土曲	26.6	30.4	曲表外被绿色棒曲霉孢子, 裂口自然, 泡度好, 断面为淡黄色, 无黑心现象。
对照土曲	26.2	30.6	曲表外被绿色棒曲霉孢子, 裂口自然, 泡度好, 断面为淡黄色, 无黑心现象。

注: GQ 为本厂优选的根霉种。

观上观察, 而受到忽视, 这就是生产实际中, 有时候认为是好的成曲, 其出酒不好的道理。

2.2 棒曲霉与酵母

棒曲霉与酵母是一个单边依存的关系。制曲原料中营养成分, 酵母可直接利用的很少, 酵母在曲中单独存在时, 其繁殖的数量很有限。当棒曲霉或根霉将原料中的成分分解后, 为酵母繁殖提供了源源不断的养分, 使酵母能够大量繁殖。通过一个水-米粉系统, 可以说明这个问题。将干米粉灭菌后, 加入无菌水制成 5% 的米粉悬液 200 ml。即为米粉-水系统, 分别接种棒曲霉(HD-11)、酵母、棒曲霉和酵母, 并以不接种的米粉-水系统为对照, 30℃保温静置培养, 12 h 后开始取样, 以后每 24 h 取样一次, 统计各系统中酵母数量, 含糖量, 以及糖化酶活性, 终了时间测定系统中的棒曲霉菌丝体重量(干重)。从试验结果可以看到, 酵母可以在米粉-水系统中增殖, 但增长缓慢, 数量有限。棒曲霉单独存在于该系统时, 12 h 以后含糖量发生明显变化, 系统中可见菌丝体。当酵母和棒曲霉共处同一系统时, 酵母增长比单独时增长快, 系统含糖量 60 h 后增加显著; 棒曲霉增长比单独培养增长慢, 36 h 后才可见到少量菌丝体, 收获时, 干重明显低于棒曲霉单独存在于系统中的干重。棒曲霉的存在可以促进酵母生长, 而酵母的生长对棒曲霉有一定的抑制作用。

棒曲霉分解的营养为酵母所利用, 实际上这些营养也是棒曲霉生长所需的, 因此, 棒曲霉与酵母的关系第一层是单边依存, 第二层是竞争关系, 主要是营养竞争。相对而言, 酵母有更快的繁殖速度, 当酵母数量繁殖较大时, 反过来会抑制棒曲霉生长。但两者的相互关系, 总体上棒曲霉是起主导作用的。

2.3 棒曲霉与细菌

由于曲的营养状况和水分状况不利于细菌的生长繁殖, 细菌存在的数量较低, 也比较稳定, 两者存在较弱的相互关系。关系的类型与酵母类似, 只是强度较弱。

2.4 根霉与酵母

根霉与酵母的关系如棒曲霉与酵母的关系, 但根霉对酵母繁殖的刺激作用比棒曲霉更加强烈。反过来, 酵母对根霉也有较强的反作用。表 4 可说明这种现象。

由表 3, 表 4 可知, 加入 1/4000 硫酸铜即可抑制 0.05% 的酵母生长, 加入硫酸铜后, 种曲的糖化率明显提高, 对发酵率没有影响, 而加入土曲中的效果不明显。只要母曲中酵母被抑制, 土曲中

表 4 小曲中加入硫酸铜对糖化率和发酵率的影响

项目	糖化率	发酵率	出酒率 (%)
1/4000 硫酸铜制种曲	24	31.4	57.1
1/4000 硫酸铜制土曲	21.5	31.9	58.0
本厂土曲	26.6	30.4	55.3
本厂引曲	13	31.6	57.5

酵母数也会降低, 所以只在母曲中加入硫酸铜即可。

纯种根霉添加不同酵母量对糖化、发酵也有影响, 当酵母添加到一定量时, 糖化、出酒都受到不利影响。结果见表 3。

2.5 根霉与细菌

根霉与细菌的关系同于棒曲霉与细菌的关系。微生物种群存在人为的干预。自然制曲微生物种群或多或少总是偏离我们所理想的平衡状态。给予一些人为干扰, 可以使这种平衡向我们需要的方向发展。

2.5.1 温度调节 在较低温度下(25~28℃), 根霉生长受影响较小, 而棒曲霉等受影响相对较大, 因此可通过温度控制来调节根霉、棒曲霉生长比例。

2.5.2 生长抑制剂 添加特异性抑制剂, 可分别抑制酵母菌和细菌生长, 如添加抗生素可抑制细菌生长, 硫酸铜可抑制酵母生长, 从而可抑制酵母、细菌的数量。

2.5.3 添加人工培养的纯种 纯种培养的棒曲霉、根霉或酵母, 按合适的比例添加到引曲或土曲中, 可以增加相应微生物种群的数量。

3 讨论

曲中微生物种群相互关系见图 1。

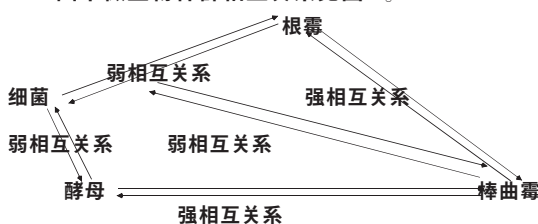


图 1 曲中微生物种群的相互关系

参考文献:

- [1] 中国科学院微生物研究所. 常见与常用真菌[M]. 北京: 科学出版社, 1978.

(上接第 34 页)

为获得霉菌纯培养, 可用平板划线法作多次分离, 再采用稀释孢子液培养法分纯。纯培养是霉菌鉴定及菌种保存的前提条件, 坚持每月继代一次能有效维护菌种性能。

3.2 目前霉菌分类仍以形态为主要依据, 因而平板培养基上的菌落形态、载玻片培养基上的形态、制片标本等在菌株鉴定中十分重要。菌落形态直观但只看到菌体的表面形态; 制片标本制作简单快捷但部分结构在制片中不可避免地破坏, 使观察到的结构不完整; 载玻片培养能观察到从孢子萌芽至菌体成熟的全过程, 但由于种种因素的影响, 培养效果有时欠佳, 不一定每次培养均能达到预期效果, 因而 3 种形态鉴定方法相辅相成, 缺一不可。对少数形态

十分形似而难于区分的种, 采用简单的生理试验便可区分, 如前述的黑根霉和米根霉作生长温度试验来区分。

3.3 供试小曲的霉菌以根霉为主, 除黑根霉(不耐高温, 小曲中难以生长繁殖)外, 其余各种根霉均占一定比例, 毛霉量较少, 曲霉及青霉只是偶尔出现, 数量极少。

参考文献:

- [1] 康明官. 小曲白酒生产指南[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 2000.
- [2] 诸葛健, 王正祥. 工业微生物实验技术手册[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 1994.
- [3] 《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.