

清香大曲及酒醅中地衣芽孢杆菌的分离鉴定

刘桂君^{1,2} 朱婷婷² 刘红霞² 闻泽喜² 胡建华² 郝文军² 李兰英²

(1.北京市辐射中心,北京 100021;2.北京顺鑫农业股份有限公司牛栏山酒厂,北京 101301)

摘要: 从牛栏山酒厂清香大曲和酒醅中分离出 23 株芽孢杆菌,通过柠檬酸盐与丙酸盐利用、产酶、需厌氧、V.P、酪素水解、酪氨酸水解、酸性培养基、耐盐性、生长温度、产酱香物质等生理生化实验进行综合鉴定,鉴定出 12 株为地衣芽孢杆菌。

关键词: 微生物; 地衣芽孢杆菌; 牛栏山酒厂; 生理生化实验

中图分类号:Q93-3;TQ920;TS261.1

文献标识码:A

文章编号:1001-9286(2010)01-0031-05

Isolation and Identification of *Bacillus licheniformis* from Fen-flavor Daqu Starters and the Fermented Grains

LIU Gui-jun^{1,2}, ZHU Ting-ting², LIU Hong-xia², WEN Ze-xi², HU Jian-hua², HAO Wen-jun² and LI Lan-ying²

(1.Beijing Radiation Center, Beijing 100021;2. Niulanshan Distillery, Shunxin Agriculture Co.Ltd., Beijing 101301, China)

Abstract: Twenty-three *Bacillus* strains were isolated from Fen-flavor Daqu starters and the fermented grains in Niulanshan Distillery. Through the operation of a series of physiological and biochemical experiments such as using citrate and propionate, enzyme-producing, aerobic and anaerobic, V.P, hydrolyzation of casein and tyrosine, acidity culture medium, salt endurance, growth temperature, Maotai-flavor-producing etc., 12 strains were finally identified as *Bacillus licheniformis*.

Key words: microbe; *Bacillus licheniformis*; Niulanshan Distillery; physiological and biochemical experiments

芽孢杆菌是大曲中常见微生物,也是重要类群之一。地衣芽孢杆菌一直以来被认为是酱香型白酒高温大曲中特有的微生物,本课题组研究发现,在牛栏山酒厂生产用的多种清香大曲、出池酒醅中同样存在地衣芽孢杆菌,对分离出 23 株芽孢杆菌进行生理生化实验,鉴定出 12 株地衣芽孢杆菌,鉴定结果与中国食品发酵工业研究院分子鉴定结果一致。本文主要介绍地衣芽孢杆菌的生理生化鉴定实验方法,为地衣芽孢杆菌的鉴定提供比较完备的一套方法。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 大曲、酒醅

牛栏山酒厂生产用清香大曲、酿酒车间酒醅。

1.1.2 分离用培养基

肉汁培养基:牛肉膏 0.3%,蛋白胨 1.0%,NaCl 0.5%,琼脂 2.0%,pH 7.0~7.2,121℃,灭菌 30 min。

1.2 方法

1.2.1 分离方法

取大曲干粉或酒醅 0.5 g,加入带有玻璃珠的无菌水三角瓶中,摇床培养 30 min,于 60℃水浴 30 min,然后

用接种环蘸取,在肉汁培养基平板上划线分离。培养后挑取单菌落继续划线分离,直到得到单菌落纯菌株为止。

1.2.2 地衣芽孢杆菌生理生化鉴定实验

根据上述分离培养基和分离方法,共计分离得到芽孢杆菌 23 株,编号分别为 1[#]、2[#]、3[#]、4[#]……22[#]、23[#],进一步对分离菌株进行筛选和鉴定。地衣芽孢杆菌鉴定参考《伯杰氏细菌鉴定手册》及《常见细菌系统鉴定手册》(东秀珠,蔡妙英等编著)方法,有所改进。

1.2.2.1 柠檬酸盐与丙酸盐利用实验

某些细菌能利用柠檬酸盐或丙酸盐作为唯一碳源,并利用磷酸铵作为氮源,将柠檬酸分解为二氧化碳,则培养基中因有游离钠离子存在而呈碱性。培养基配方:柠檬酸钠(或丙酸钠)0.2%、NaCl 0.5%、MgSO₄·7H₂O 0.01%、(NH₄)₂HPO₄ 0.1%、K₂HPO₄·3H₂O 0.1%、1%溴百里酚蓝水溶液 10 mL,琼脂 2%。以上成分除指示剂外,其余加热溶解,调节 pH6.8~7.0,并加入指示剂,使培养基呈草绿色,分装试管,灭菌后摆斜面。

取幼龄菌种接种于斜面上,适温培养 3~7 d,培养基呈碱性(蓝色)者为阳性反应,不变者为阴性。只有地衣芽孢杆菌可以利用丙酸钠,为阳性反应,而其他芽孢杆菌均

收稿日期:2009-10-13

作者简介:刘桂君,女,助理研究员,主要从事微生物发酵及酿酒的研究。

不能利用丙酸钠,为阴性反应,但很多种芽孢杆菌都可以利用柠檬酸钠。

1.2.2.2 产酶实验

1.2.2.2.1 过氧化氢酶实验

过氧化氢酶又称接触酶,能催化过氧化氢分解水和氧。将芽孢杆菌接种于肉汤培养基斜面上,适温培养18~24 h。取干净的载玻片,在上面滴1滴3%~5%的 H_2O_2 ,挑取1环培养18~24 h的菌苔,在 H_2O_2 溶液中涂抹,若有气泡(氧气)出现,则为过氧化氢酶阳性,无气泡者为阴性。也可将过氧化氢溶液直接加到菌种斜面上,观察气泡的产生。

1.2.2.2.2 淀粉酶实验

某些细菌代谢产生淀粉酶,把淀粉水解为无色糊精等小分子,或进一步水解为麦芽糖或葡萄糖。淀粉水解后,遇碘不变蓝色。

培养基:在肉汤蛋白胨琼脂中添加0.2%的可溶性淀粉,分装三角瓶,于121℃灭菌20 min备用。卢戈氏(Lugol)碘液:碘片1 g,碘化钾2 g,蒸馏水300 mL,先将碘化钾溶解在少量水中,再将碘片溶解在碘化钾溶液中,混匀,定容。

将灭菌后的培养基冷却到50℃左右,倒成平板,凝固后,取18~24 h的纯培养物点于平板上,每皿可点种3~5个菌株,适温培养2~4 d,形成菌落后,在平板上滴加卢戈氏碘液,以铺满菌落周围为度,平板成蓝色。如果菌落周围有无色透明圈出现,说明淀粉已经被水解,实验为阳性,否则为阴性。透明圈大小说明水解淀粉能力。

1.2.2.2.3 纤维素酶实验

采用刚果红染色法,如果有刚果红存在,刚果红可以与纤维素结合成红色螯合物,培养基颜色为红色。如果培养基中有能够产纤维素酶的细菌,将纤维素分解,不能形成螯合物,在菌落周围形成透明圈。这样可以鉴定产纤维素酶的细菌。

培养基的配制:CMC-Na 5~10 g,酵母膏1 g, KH_2PO_4 0.25 g,琼脂15 g,将上述物质溶解后,用蒸馏水定容到1000 mL,加入10 mg/mL的刚果红溶液5 mL,于121℃灭菌20 min,冷却倒平板,凝固后待用。取18~24 h的培养物点于平板上,每皿点种3~5个菌株,适温培养2~4 d,形成菌落后,观察产生透明圈情况,产生纤维素酶的菌落周围将出现明显的透明圈,否则为阴性。

1.2.2.2.4 明胶液化实验

明胶是一种动物性蛋白,明胶的水解是由于有些细菌具有明胶酶,能将明胶先水解为多肽,进一步水解为氨基酸,失去凝胶性质而液化。明胶培养基本身低于20℃凝固,高于24℃则自行液化。明胶分解后,其分子变小,

即使在低于20℃的温度下也不再凝固。

培养基:蛋白胨5 g,明胶120 g,蒸馏水1000 mL,调节pH为7.2~7.4,分装试管,培养基高度4~5 cm,于115℃灭菌20 min。

挑取18~24 h培养物,以穿刺法接种于试管中央,于20~22℃培养。每天观察,液化为阳性,否则为阴性。

1.2.2.3 需厌氧实验

在培养基中加入还原剂,如巯基醋酸钠和甲醛合次硫酸钠等,以除去培养基中的氧气或氧化型物质,使厌氧菌能在有氧情况下生长。培养基:酪素水解物20 g,NaCl 5 g,巯基醋酸钠 $HS \cdot CH_2COONa$ 2 g,甲醛合次硫酸钠 $HOCH_2 \cdot SO_2Na$ 1 g,琼脂15 g,蒸馏水1000 mL,调节pH 7.2,分装试管121℃灭菌20 min,培养基不摆斜面。

用1环肉汤菌液,穿刺接种到上述培养基中,必须穿刺到管底。于30℃培养3~7 d观察结果。如细菌在琼脂柱表面上生长者为好氧菌,如沿着穿刺线生长者为厌氧菌或兼性厌氧菌。

1.2.2.4 乙酰甲基甲醇实验(V.P实验)

某些细菌在葡萄糖蛋白胨水培养基中能分解葡萄糖产生丙酮酸,丙酮酸缩合,脱羧成乙酰甲基甲醇,后者在强碱环境下,被氧化为二乙酰,二乙酰与蛋白胨中的胍基生成红色化合物,称V.P阳性反应。培养基:蛋白胨5 g,葡萄糖5 g,NaCl 5 g,蒸馏水1000 mL。调节pH 7.0~7.2,分装试管,每管装4~5 mL,于115℃灭菌20 min。试剂:40%NaOH(或KOH),肌酸。

接种于上述培养液中,适温培养4~6 d。如为阴性,可适当延长培养时间。取培养液(约2 mL)和等量的40%NaOH相混合,加少量(0.5~1.0 mg)肌酸,充分振荡2~5 min,如培养液出现红色即为阳性。有时需放置更长时间或在热水中稍加热,以加速反应进行。

1.2.2.5 酪素水解实验

牛奶平板的制备:取5 g脱脂奶粉加入50 mL蒸馏水中(或用50 mL脱脂牛奶),取1.5 g琼脂溶于50 mL蒸馏水中,将两溶液分开灭菌。待冷却至45~50℃时,将两液混匀倒于平板,即成牛奶平板。将平板倒置过夜,使表面水分干燥,然后将菌种点接在平板上,每皿可点接3~5个菌株。适温培养3~5 d,记录菌落周围和下面酪素是否已被分解而呈透明。配制该培养基时,切勿将牛奶和琼脂混合灭菌,以防牛奶凝固。

1.2.2.6 酪氨酸水解实验

有些细菌具有酪氨酸酶,能使含酚类的化合物如酪氨酸、酚等氧化成醌,再经脱水、聚合等一系列反应,最后形成黑色沉淀物质。培养基:采用肉汤蛋白胨培养基加0.1%L-酪氨酸,调节pH为7.0,分装后于121℃灭菌

20 min 后摆成斜面。接种后培养 3~7 d, 观察斜面有黑色素者为阳性反应。

1.2.2.7 酸性培养基实验

培养基: 蛋白胨 10 g, 葡萄糖 20 g, 蒸馏水 1000 mL, 调节 pH 5.7, 于 115 °C 灭菌 20 min。取菌液 1 环, 接种于上述培养基中, 同时接种普通肉汤 (pH 7.0) 作对照。适温培养 1~3 d, 观察生长情况。该培养液要求十分澄清, pH 必须准确, 用 pH 计调测。

1.2.2.8 耐盐性实验

耐盐性实验是观察渗透压对细菌生长的影响。由于不同菌类耐盐性不同, 故常以此作为鉴别特征。一般可根据不同种类的菌株, 选择其适合生长的培养基, 在其中加入不同量的 NaCl, 接种后观察其生长与否, 以判断其耐盐性。

根据鉴定需要, 以肉汤培养液配成不同浓度 NaCl 溶液, 如 2%、5%、7%、10% 等。培养基要求十分澄清, 接种时应采用幼龄菌液接种, 适温培养 3~7 d, 与未接种的对照管对比, 目测生长情况。

1.2.2.9 生长温度实验

细菌生长的最高、最适、最低温度, 常常是某些细菌鉴定的特征之一。测定细菌的生长温度, 要求培养液十分澄清 (如营养肉汁培养基), 并采用液体菌种直接接种, 放置于恒温水浴培养。在指定温度下培养 2~5 d, 观察生长情况。若在接近 0 °C 的低温培养, 则观察时间可延长 7~10 d 或更长。培养 5 d 能生长者按生长计算, 否则按不生长计算, 可疑者需重新进行培养实验。

1.2.2.10 产酱香实验

地衣芽孢杆菌在酱香型白酒生产中的一个重要作用

就是产生酱香物质, 这与其产生蛋白酶类有关, 蛋白酶将蛋白质分解成肽类和氨基酸, 经过发酵会产生酱香物质。本实验采用 3 种培养基鉴定地衣芽孢杆菌是否产生酱香物质。

甘氨酸培养基: 甘氨酸 5 g, 葡萄糖 10 g, NaCl 3 g, 蒸馏水 1000 mL, pH 6~7, 分装 50 mL 到 100 mL 三角瓶中, 于 121 °C 灭菌 20 min。营养肉汤培养基: 牛肉膏 3 g, 蛋白胨 10 g, NaCl 5 g, 蒸馏水 1000 mL, pH 7.0~7.4, 分装 50 mL 到 100 mL 三角瓶中, 于 121 °C 灭菌 30 min。以上两种培养基均为液体培养基, 取培养 18~24 h 的菌种接入到液体培养基中, 摇床 37 °C 培养 48~60 h, 取出, 鉴定是否产生酱香物质。

麸皮培养基: 麸皮 1000 g, NaOH 6 g, 蒸馏水 600 mL, 分装到 500 mL 三角瓶中, 于 121 °C 灭菌 40 min。接入液体培养菌种 10%, 恒温箱培养 3~5 d, 取出, 鉴定是否产生酱香物质。

1.2.2.11 糖发酵实验

糖发酵实验主要是看该种糖能不能被微生物利用, 如果能够利用则会发酵产酸, 培养基中的指示剂会由紫色变黄色, 同时可能伴有气泡产生, 如果发酵产气则试管中倒扣的杜氏管中培养基会被排出, 里面充满气体。本实验中糖发酵实验选取葡萄糖、麦芽糖、蔗糖、乳糖、果糖、甘露醇、阿拉伯糖、木糖等。培养基为: $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 1 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.2 g, KCl 0.2 g, 酵母膏 0.2 g, 糖或醇类 10 g, 蒸馏水 1000 mL, 0.04% 溴甲酚紫乙醇溶液 20 mL, 调节 pH 7.0~7.2, 分装试管, 每管装 10 mL 培养基, 试管内放有杜氏发酵管, 于 115 °C 灭菌 20 min, 排净杜氏管中的空气。

表 1 盐、产酶实验结果

项目	菌株																						
	1 [#]	2 [#]	3 [#]	4 [#]	5 [#]	6 [#]	7 [#]	8 [#]	9 [#]	10 [#]	11 [#]	12 [#]	13 [#]	14 [#]	15 [#]	16 [#]	17 [#]	18 [#]	19 [#]	20 [#]	21 [#]	22 [#]	23 [#]
柠檬酸盐	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
丙酸盐	-	+	-	-	+	-	-	+	-	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	-
过氧化氢酶	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
淀粉酶	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
纤维素酶	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
明胶液化 (蛋白酶)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
厌氧生长	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
V.P 实验	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
酪素水解	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
酪氨酸水解	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
甘氨酸培养 产酱香	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
肉汁培养 产酱香	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
麸皮培养 产酱香	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

注: “+”表示能够利用该种物质或者能够产生该种物质, “-”表示不能利用该种物质或者不能够产生该种物质。

表 2 耐酸性、耐盐性、生长温度实验结果

项目	菌株																						
	1 [#]	2 [#]	3 [#]	4 [#]	5 [#]	6 [#]	7 [#]	8 [#]	9 [#]	10 [#]	11 [#]	12 [#]	13 [#]	14 [#]	15 [#]	16 [#]	17 [#]	18 [#]	19 [#]	20 [#]	21 [#]	22 [#]	23 [#]
耐酸性实验	营养肉汤 (pH 5.7)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	营养肉汤 (pH 7.0)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
耐盐性实验	NaCl 2%	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	NaCl 5%	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	NaCl 7%	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	NaCl 10%	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+
生长温度实验	4℃	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	10℃	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	20℃	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	30℃	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	40℃	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	50℃	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	55℃	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	65℃	-	-	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	+	-	+	-	-	+	-

注：“+”表示能够生长，“-”表示不能生长。

表 3 糖发酵实验结果

项目	菌株																						
	1 [#]	2 [#]	3 [#]	4 [#]	5 [#]	6 [#]	7 [#]	8 [#]	9 [#]	10 [#]	11 [#]	12 [#]	13 [#]	14 [#]	15 [#]	16 [#]	17 [#]	18 [#]	19 [#]	20 [#]	21 [#]	22 [#]	23 [#]
麦芽糖(产酸)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
蔗糖(产酸)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
葡萄糖(产酸)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
果糖(产酸)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
阿拉伯糖(产酸)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
乳糖(产酸)	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+
木糖(产酸)	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+
甘露醇(产酸)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

注：“+”表示产酸，“-”表示不产酸。

以 18~24 h 的幼龄菌种，接种 1 环到上述培养基中，适温培养 3~5 d，观察指示剂是否由紫色变黄，杜氏管中是否有空气。

2 结果与分析

生理生化实验鉴定结果(见表 1~表 3)。

2.1 柠檬酸盐与丙酸盐利用

柠檬酸盐与丙酸盐利用实验结果见表 1。23 株菌株均可以利用柠檬酸盐，这也与多种芽孢杆菌都可以利用柠檬酸钠的特征符合。只有地衣芽孢杆菌可以利用丙酸盐，2[#]、5[#]、8[#]、10[#]、13[#]、14[#]、16[#]、17[#]、18[#]、19[#]、21[#]、22[#] 这 12 株菌株均可以利用丙酸盐，可以初步认为，这 12 株菌株为地衣芽孢杆菌，进一步进行其他的生理生化实验验证。

2.2 淀粉酶实验结果

实验的 23 株菌株中，11[#] 菌株不能水解淀粉，未产生透明圈。3[#]、7[#]、9[#] 3 株菌株产生的透明圈最大，几乎铺满整个平板，其余菌株产生的透明圈大小不一。各菌株水

解淀粉的能力各不相同，3[#]、7[#]、9[#] 3 株菌株水解淀粉的能力最强，在初步筛选出的 12 株地衣芽孢杆菌中，5[#] 菌株产淀粉酶能力较强，21[#] 产淀粉酶能力较差。透明圈见图 1、图 2、图 3、图 4、图 5 和图 6。

2.3 酪素水解实验结果

牛奶的重要组成成分为酪蛋白，所以配制牛奶琼脂培养基，如果菌株可以利用酪蛋白则产生透明圈，观察显示很直接。酪素水解实验结果见表 1。在实验菌株中，1[#]、3[#]、7[#]、9[#] 菌株产生的透明圈最大，其中接种 9[#] 菌株的平板完全变为透明的，说明水解酪素的能力最强。其余菌株对酪素水解能力各不相同。

2.4 明胶液化实验结果

明胶液化实验结果见表 1。在明胶液化实验中，1[#]、2[#]、3[#]、4[#]、7[#]、8[#]、9[#]、11[#]、12[#]、16[#]、17[#] 菌株液化明胶的能力最强，接种 7 d 后将明胶全部液化。说明这些菌株产生的类蛋白酶类丰富，使明胶水解迅速。在所有菌株中，6[#]、19[#] 菌株对明胶的液化能力最弱。



图1 3# 菌株产透明圈平板



图2 5# 菌株产透明圈平板



图3 7# 菌株产透明圈平板



图4 8# 菌株产透明圈平板

2.5 产酱香实验结果

地衣芽孢杆菌是酱香大曲中的重要微生物,能够产生酱香物质,实验的23株菌株均是从清香大曲和酒醅中



图5 9# 菌株产透明圈平板

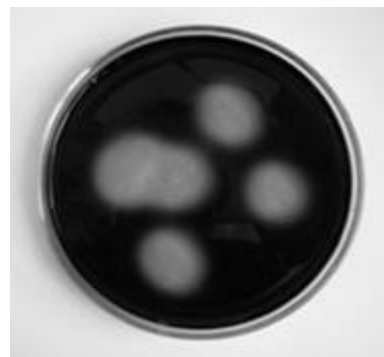


图6 21# 菌株产透明圈平板

分离得到的,因此对其是否产酱香进行确认。通过两种液体培养基(甘氨酸培养基和营养肉汤培养基)和麸皮固体培养基发酵培养,结果见表1。结果表明,这些菌株虽然能够产生酱香物质,但酱香气味不典型,不明显,而且每个菌株产生的气味都各不相同。

耐酸性、耐盐性、生长温度实验结果见表2,糖发酵实验结果见表3。

2.6 分子鉴定实验

对以上经过生理生化实验筛选出来的地衣芽孢杆菌进行分子鉴定。从地衣芽孢杆菌中提取16S rDNA片段,通过测序获得16S rDNA序列信息,再与16S rDNA数据库或其他数据库进行比较,从而鉴定种类。本实验与中国食品发酵工业研究院合作完成。

鉴定中用到的两对细菌通用引物是WBAC1/WBAC2和341/534。DNA提取采用煮沸法和TIANGEN试剂公司的细菌基因组提取试剂盒两种提取方法,DNA纯化使用上海申能博彩琼脂糖凝胶回收纯化试剂盒。采用美国ABI 9700型PCR仪进行扩增。

由上海生工生化公司测序,将测定的序列处理后提交到NCBI的Gene Bank进行序列比对,与*Bacillus Licheniformis*(地衣芽孢杆菌)的一致率达到100%。鉴定结果为地衣芽孢杆菌。

3 结论

3.1 从大曲和酒醅中分离微生物,于60℃水浴30 min
(下转第38页)

包包大曲内通过系统分离和筛选出来的,具有非常突出的代表性。同时也印证了作为多粮浓香型酒厂的宜宾叙府酒业在长期生产和使用的偏高温大曲内有嗜热细菌存在。

2.5.2 该嗜热细菌的 16S rDNA 序列与其他近缘种的系统发育树可以得出:嗜热的 GWJ-III(GQ480504)细菌与 *Lysinibacillus boronitolerans* T-10a(T)聚在一簇的相似度为 98%。其很可能是 *Lysinibacillus* 属的一个新菌种,很有必要深入研究。同时也预示着我国浓香型白酒酿酒微生物区系中有大量的新分类单位菌株的存在。

2.5.3 从该菌的生理生化试验和微生物高温培养观察来看, GWJ-III 具有很强的淀粉水解能力和较强葡萄糖氧化能力,这表明该菌在多粮浓香型白酒发酵生产、生香过程中起着非常大的作用。同时,其产 H_2S 的能力也似乎表明,其对于除去发酵产物中的“泥臭”亦有一定的贡献。其出现在偏高温大曲中,可能与宜宾多粮浓香型白酒酒体丰满,带有突出的“陈香”(或称酱香)有一定关系^[6-9]。

3 结论

从多粮浓香型酒厂中的特级曲药中分离筛选得到一株嗜热细菌,能在 65℃ 下正常生长繁殖,对其进行 16S rDNA 系统发育分析及生理生化分析,鉴定其为 *Lysinibacillus* 属微生物,并很可能为该属的一个新种。可能为解析多粮浓香型酒白酒酒体形成原因提供一定的理论基础,亦有可能用于浓香型白酒生产。

参考文献:

[1] 沈才洪,许德富,等.大曲“酒化力”的探讨[J].酿酒科技,2004,

(3):22-23.

[2] 徐占成.酒体风味设计学[M].北京:新华出版社,2000.

[3] 刘兴照.高温大曲的特性及作用[J].食品与发酵工业,1996,(2):79-81.

[4] 庄名扬,王仲文,孙达孟,等.美拉德反应与酱香型白酒[J].酿酒,1999,(4):42-46.

[5] 吴衍庸.酒曲微生物分析与白酒香型初探[J].酿酒科技,2004,(5):38-39.

[6] 东秀珠,蔡妙英.常见细菌系统鉴定手册[M].北京:科学出版.

[7] R.E.布坎南,N.E.吉本斯.伯杰细菌鉴定手册(第八版)[M].北京:科学出版社,1984.

[8] Rainey FA, Naomi WR, Kroppenstedt RM. et al. The genus *Nocardiopsis* represents a phylogenetically coherent taxon and a distinct actinomycete lineage: proposal of *Nocardiopsaceae* fam. nov[J]. Int J Syst Bacteriol, 1996, 46: 1088-1092.

[9] Brosius J, Dull TJ, Sleeter DD, et al. Gene organization and primary structure of a ribosomal DNA operon from *Escherichia coli* [J]. J Mol Biol, 1981, 148: 107-127.

[10] Chun, J., Lee, J.-H., Jung, Y., et al., EzTaxon: a web-based tool for the identification of prokaryotes based on 16S ribosomal RNA gene sequences[J]. Int J Syst Evol Microbiol. 2007, 57, 2259-2261.

[11] Kimura M. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences[J]. J Mol Evol, 1980, 16: 111-120.

[12] Ahmed I, Yokota A, Yamazoe A, Fujiwara T. , Proposal of *Lysinibacillus boronitolerans* gen. nov. sp. nov., and transfer of *Bacillus fusiformis* to *Lysinibacillus fusiformis* comb. nov. and *Bacillus sphaericus* to *Lysinibacillus sphaericus* comb. Nov[J]. Int J Syst Evol Microbiol. 2007 May; 57(Pt 5): 1117-25.

(上接第 35 页)

可以排除酵母、霉菌等的干扰,而芽孢杆菌也不会死亡,所以该方法比较容易分离得到纯芽孢杆菌菌株。

3.2 只有地衣芽孢杆菌可以利用丙酸盐,所以是否利用丙酸盐可以作为鉴定地衣芽孢杆菌的一个重要依据,但是其他生理生化实验同样是必不可少的。

3.3 在产酶实验中,所有菌株均产生过氧化氢酶,这与芽孢杆菌的性质相符合,但是分离得到的所有芽孢杆菌均不产纤维素酶。产淀粉酶实验中,淀粉水解是逐步进行的过程,与菌种产生淀粉酶的能力、培养时间、培养基淀粉含量和 pH 等均有一定关系。培养基必须为中性或微酸性,以 pH7.2 最适。

3.4 地衣芽孢杆菌产酱香不典型,因为这些菌株都是从清香大曲和酒醅中分离得的,所以在发酵过程中所起的

作用也各不相同,产酱香不典型的特征正好可以应用到二锅头酒的生产中,不会将酒的香型改变,而且还可以增加酒体的醇厚度。

3.5 全部的生理生化实验都是与地衣芽孢杆菌的特征相对应的,结合丙酸盐利用实验和一系列的生理生化实验可以基本鉴定地衣芽孢杆菌。本文为地衣芽孢杆菌的鉴定提供了简便、易行的实验方法。

参考文献:

[1] 中国科学院微生物研究所伯杰氏细菌鉴定手册翻译组译.伯杰氏细菌鉴定手册(第八版)[M].北京:科学出版社,1984.

[2] 东秀珠,蔡妙英,等.常见细菌系统鉴定手册[M].北京:科学出版社,2001.