

堆积醅中耐高温细菌的分离与鉴定

施小明¹, 钟玉叶¹, 徐 岩², 谢玉球¹, 谢 旭¹

(1. 江苏双沟酒业股份有限公司, 江苏 宿迁 223911; 2. 江南大学生物工程学院, 江苏 无锡 214122)

摘要: 从江苏双沟酒业股份有限公司堆积醅中筛选得到 7 株耐高温细菌。形态特征观察、生理生化特性测定结果结合 16S rDNA 序列同源性分析以及部分基因特异性序列分析, 结果表明, 7 株菌株中 3 株为地衣芽孢杆菌, 3 株为枯草芽孢杆菌, 1 株解淀粉芽孢杆菌。

关键词: 微生物; 嗜热细菌; 枯草芽孢杆菌; 地衣芽孢杆菌; 解淀粉芽孢杆菌

中图分类号: Q93-3; TS261.1

文献标识码: A

文章编号: 1001-9286(2011)04-0033-03

Isolation & Identification of Thermophilic Bacteria from Stacking Fermented Grains

SHI Xiao-ming¹, ZHONG Yu-ye¹, XU Yan², XIE Yu-qiu¹ and XIE Xu¹

(1. Shuang'gou Liquor Industry Co. Ltd., Suqian, Jiangsu 223911; 2. Bioengineering College of Jiangnan University, Wuxi, Jiangsu 214122, China)

Abstract: 7 thermophilic bacteria strains were isolated from stacking fermented grains in Shuang'gou Liquor Industry Co. Ltd. Through a series of analysis including physiochemical analysis and biochemical analysis, 16S Rdna sequencing homology analysis, and partial specific gene sequence analysis, 3 strains were identified as *Bacillus licheniformis*, 3 strains were identified as *Bacillus subtilis*, and 1 strain identified as *Bacillus amyloliquefaciens*. (Tran. by YUE Yang)

Key words: microbes; thermophilic bacteria; *Bacillus subtilis*; *Bacillus licheniformis*; *Bacillus amyloliquefaciens*

白酒生产主要依赖于酿酒微生物代谢及其所产生的酶所催化的各种酶促反应而得以进行, 高温堆积为白酒生产提供了各种复杂的微生物和酶类, 这些微生物的种类和数量在一定程度上直接影响白酒品质的好坏。了解这些微生物的种类, 进一步探讨其影响浓香型白酒风味物质的作用与机理, 认识微量香气成分对白酒风味的作用, 掌握酿酒规律, 提高酿酒生产技能, 从而能推动酿酒科学的技术进步, 更加细致、科学地认识白酒酿造机理。在高温堆积过程中富集的主要是酵母, 同时细菌、霉菌也明显增多^[1]。由于高温堆积温度可以达到 50℃, 细菌类的微生物主要是一些中度嗜热细菌, 大都具有一定的糖化力、液化力和较高的蛋白质分解力, 能代谢酿酒原料中的蛋白、淀粉等生成香味物质, 例如嗜热芽孢杆菌是产生酱香风味和芝麻香风味的主要菌种^[2]。本文主要对双沟酒业堆积发酵工艺中的耐高温细菌进行了研究。

1 材料与方法

1.1 样品

江苏双沟酒业股份有限公司高温堆积工艺中的堆积醅。

1.2 培养基

分离培养基的配制: 称取蛋白胨 10 g, NaCl 5 g, 牛肉膏 5 g, 琼脂 20 g, 溶于 1000 mL 蒸馏水中, 调 pH7.2~7.4, 121℃ 灭菌 30 min。

1.3 耐高温菌株的分离筛选

取堆积醅 100 g 溶于 1000 mL 无菌水中, 摇匀, 取 100 μL, 接种到试管中, 55℃ 培养, 每 12 h 传代 1 次, 传代 10 次。然后稀释 10⁶ 涂布平板, 45℃ 培养 16 h, 挑取不同形态的单菌落。将获取的单菌落划平板, 纯化菌株。

1.4 耐高温细菌的生理生化鉴定

按文献《伯杰细菌鉴定手册》^[3]、《常见细菌系统鉴定手册》^[4]对获得的菌株进行生理生化实验。

1.5 耐高温菌株的 DNA 提取和 16S rDNA PCR 扩增^[5]

采用 TakaraDNA 基因组提取试剂盒提取菌株基因组 DNA, 将基因组 DNA 作为 PCR 扩增模板, 用细菌 16S rDNA 通用引物 27f: 5'-GAGCGGATAACAATTTCACACAGG-3' 和 1492R: 5'-TAC GGT TAC CTT GTT ACG ACT T 3' 作为上下游引物, 进行 PCR 反应。PCR 反应条件为: 预变性 94℃ 5 min; 变性 94℃ 1 min, 退火 55℃ 1 min, 复性 72℃ 1.5 min; 最后延伸 72℃ 5 min, 反应 30 个循环。

1.6 耐高温细菌的 16S rDNA 序列分析及系统发育树

收稿日期: 2011-01-04

作者简介: 施小明(1979-) 男, 江苏扬中人, 博士。

优先数字出版时间: 2011-03-11; 地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/52.1051.TS.20110311.1053.001.html?uid=>。

扩增的 PCR 产物送上海生物工程技术服务有限公司(Sangon)纯化并测序,测定序列长度 1000~1100 bp。测定序列在 NCBI 上进行在线分析,MEGA3.0 软件采用 Neighbor-Joining 法构建系统进化树,自展数(Bootstrap)为 100。

1.7 菌株的部分特异性基因序列的分析^[6]

提取菌株基因组 DNA,将基因组 DNA 作为 PCR 扩增模板,所用的引物为 YyaO-F/TetB-R 和 YyaR-F/TetB-R 两对引物,引物序列分别为: YyaO-F:5'-GGAACCAGTCCACAGGGTTGTGG-3'; YyaR-F:5'-CGATTGAGTGGGCRAAGGAGAA TCATTTWTGYG-GT-3'; TetB-R: 5'-CCATATAGAGCTGTTCCAATG-GAGAAG-3'。

PCR 反应条件为:94℃变性 1 min;94℃变性 1 min、52℃引物复性 1 min、72℃延伸 1 min,30 个循环;最后 72℃延伸 7 min。所得 PCR 产物用 2.0% 琼脂糖凝胶电泳在标准条件下进行检测。

2 结果与讨论

2.1 耐高温细菌的分离筛选

分离得到 7 株菌株,分别编号为 S2007-1、S2007-3、S2007-7、S2007-9、S2007-13、S2007-14 和 S2007-16。

2.2 耐高温细菌的生理生化鉴定

耐高温细菌的生理生化实验结果见表 1,参照《伯杰细菌鉴定手册》、《常见细菌系统鉴定手册》,初步认定 S2007-1、S2007-3、S2007-7、S2007-9、S2007-13、S2007-14 和 S2007-16 皆为芽孢杆菌。

表1 菌株的生理生化特征

理化实验项目	S2007-						
	1	3	7	9	13	14	16
革兰氏染色	+	+	+	+	+	+	+
运动性	+	+	+	+	+	+	+
芽孢染色	+	+	+	+	+	+	+
V.P 反应	+	+	+	+	+	+	+
淀粉水解	+	+	+	+	+	+	+
柠檬酸盐利用试验	+	+	+	+	+	+	+
接触酶	+	+	+	+	+	+	+
吲哚试验	-	-	-	-	-	-	-
甲基红试验	+	+	+	+	+	+	+
明胶液化试验	+	+	+	+	+	+	+

2.3 耐高温细菌的分子生物学鉴定

由系统发育树可看出,S2007-9、S2007-11、S2007-13 和 S2007-16 为枯草芽孢杆菌或者解淀粉芽孢杆菌;S2007-16 为枯草芽孢杆菌;S2007-1、S2007-3、S2007-14 为地衣芽孢杆菌。几株菌的系统发育树分析见图 1。

2.4 菌株的部分特异性基因序列的分析

对几株菌的部分特异性基因序列的分析结果见图 2。

解淀粉芽孢杆菌和枯草芽孢杆菌表型相似,很容易混淆,仅从同源性上很难精确确定它的分类地位。*B.sub-*

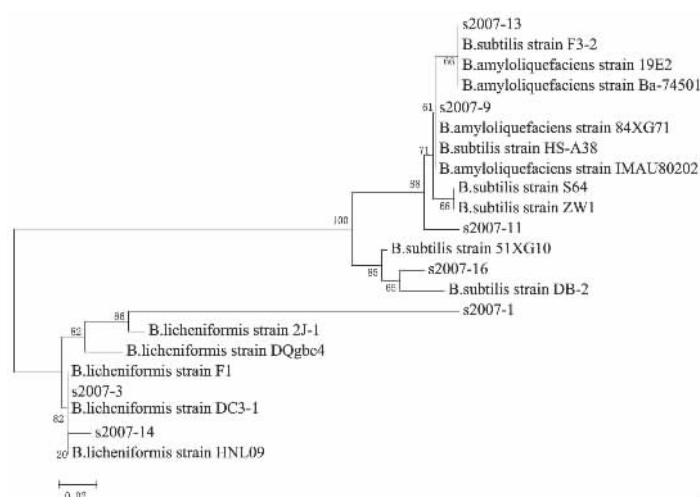
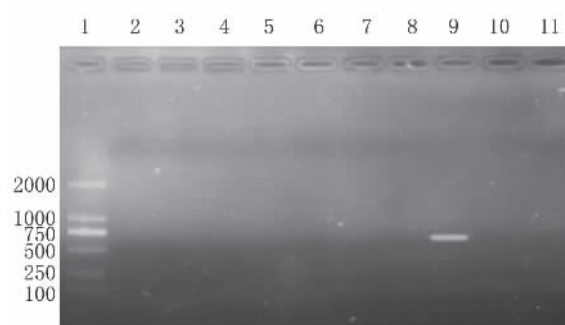


图1 几株菌的系统发育树分析结果



注:Lane 1:mark DL2000;Lane 2,3,4,5,6: 分别为空白对照, S2007-9、S2007-11、S2007-13、S2007-16 菌株基因组 PCR 产物,无引物;Lane 7,8,9,10,11:分别为空白对照、S2007-9、S2007-11、S2007-13、S2007-16 菌株基因组 PCR 产物,引物 YyaR_F/TetB_R。

图2 几株菌的部分特异性基因序列进行分析结果

tilis 和 *B.amyloliquefaciens* 含有很多相同或相似的基因,但是通过基因比较发现,*B.subtilis* 和 *B.amyloliquefaciens* 的部分基因顺序明显不同。*B.subtilis* 和 *B.amyloliquefaciens* 均含有能够编码转运蛋白的基因 tetB-tetL。在 *B.subtilis* 中,基因 yyaR (功能未知) 位于 tetB-tetL 的下游 2003 bp 处;在 *B.amyloliquefaciens* 中, yyaR 位于 tetB-tetL 的上游并且与之相邻。据此设计引物 YyaR-F/TetB-R 用于 PCR 扩增,其中正向引物 YyaR-F 分别源自 yyaR 基因的 3'末端,反向引物 TetB-R 源自基因 tetB 的 5'末端。Oleg 等已经成功地利用这对引物对多个可能为枯草芽孢杆菌或者解淀粉芽孢杆菌的菌种进行了鉴定,鉴定结果见表 2。

扩增发现 S2007-11 菌株对引物对 YyaR_F/TetB_R 的 PCR 反应为阳性,确定 S2007-11 菌属于 *B. amyloliquefaciens* 这个种,S2007-9、S2007-13、S2007-16 属于 *B. subtilis* 这个种。

2.5 讨论

2.5.1 耐高温菌是能在 45℃ 以上生长和繁殖的极端环

表2 *B. amyloliquefaciens* 和 *B. subtilis* 菌株的PCR产物鉴定结果

Species and Strains	Target genes/regions and primer pairs	
	tet B	YyaR- F/TetB- R
<i>B. amyloliquefaciens</i>		+
<i>B. subtilis subsp.</i>		-

注: ‘+’, PCR products of expected size were detected by gel electrophoresis.

‘-’, PCR products of expected size were not detected by gel electrophoresis.

境微生物,包括部分细菌、古菌和真菌。其中,最适生长温度在 45~80 °C 之间的高温菌为中度嗜热菌。这 7 株细菌是在 55 °C 条件下筛选出来的并且能在该温度条件下生长良好,为中度嗜热细菌^[7]。经鉴定后发现,这些中度嗜热细菌皆为芽孢杆菌,主要是枯草芽孢杆菌和地衣芽孢杆菌,这两种芽孢杆菌都有较强的淀粉和蛋白质水解能力,是形成酱香型白酒风格的重要菌类^[8-9]。

2.5.2 解淀粉芽孢杆菌和枯草芽孢杆菌同源性高,内含很多相同或相似的基因。但是经研究发现,这两个菌种某些相同或相似基因的排列顺序不同,因而可以利用这一差别通过同时鉴定多个基因来区分这两个菌种^[5]。

2.5.3 堆积醋中的耐高温细菌主要是枯草芽孢杆菌、地衣芽孢杆菌和解淀粉芽孢杆菌。对堆积醋中耐高温细菌的鉴定,能帮助研究人员了解这些细菌的安全性及其代谢特性,从而可以针对性的把这些细菌应用到白酒生产中。

枯草芽孢杆菌不分泌内毒素,具有较好的生物安全性,是美国食品药品监督管理局(FDA)和中国农业部批准使用的安全菌株^[10];同时枯草芽孢杆菌的蛋白酶、淀粉酶和脂肪酶活性都比较高,有利于对生产原料的充分利用,并为香味物质的合成提供充足的前驱物质^[8];枯草芽孢杆菌具有分泌蛋白的能力,可以将产生的酶分泌到胞外^[10],可以考虑液体培养后添加发酵液到酒醋中,充分利用其酶活代谢生成香味物质;但是枯草芽孢杆菌具有分泌脂肽类和肽类抗菌素的能力,应用时需要考虑对其他微生物的影响^[11]。

草兰氏阳性、腐生性地衣芽孢杆菌是高温淀粉酶、碱性蛋白酶的重要工业生产用菌株,是安全菌株,已被多个国际机构认定为 GRAS 工业菌株^[12];地衣芽孢杆菌能产生高活力的蛋白酶,能将糟醋中的蛋白质分解成氨基酸,可与其他物质反应(如与还原糖发生褐变反应)生成多种香味物质^[9];地衣芽孢杆菌对麦麸中的纤维素、半纤维素和木质素都有不同程度的降解,但以纤维素降解为主,制曲时可以应用这些菌株,使麸皮得到充分的利用^[13];地衣芽孢杆菌分泌蛋白至培养基中的能力大约是枯草芽孢杆菌的 2 倍,也可考虑液体培养后添加发酵液到酒醋中^[12];地衣芽孢杆菌能厌氧代谢葡萄糖生成 2,3-丁二醇和甘油,2,3-丁二醇和甘油含量的增加可改善白酒的甜度和

自然度^[14]。

食品加工中应用解淀粉芽孢杆菌的安全性已受到美国 FDA 的质疑。虽然大多数人认为解淀粉芽孢杆菌一般是安全的,但也有发生严重甚至致命食物中毒报道^[15]。所以在白酒生产中应用该菌株时应谨慎,甚至采取方法来抑制解淀粉芽孢杆菌的繁殖生长。

3 结论

经过研究发现江苏双沟酒业股份有限公司的堆积醋中的耐高温细菌主要是芽孢杆菌,经分离鉴定得到 3 株枯草芽孢杆菌,3 株地衣芽孢杆菌和 1 株解淀粉芽孢杆菌。这些细菌能在 45~55 °C 条件下生长良好,可以在高温堆积过程中正常生长繁殖,其代谢产物以及其对其他微生物的影响肯定会引起白酒中的风味物质的变化,从而影响白酒的质量。在今后的研究中需要检测这些耐高温细菌对白酒中风味物质的种类和含量的影响。

参考文献:

- [1] 刘宇驰,蒋英丽,邓皖玉,等.引入“酱香功能菌”概念 探索酱香型白酒风味成因[J].酿酒科技,2009,(12):47-50.
- [2] 信春晖,朱政,赵纪文,等.复粮芝麻香酒特征香味成分初探[J].酿酒科技,2008,(3):89-72.
- [3] 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.
- [4] 东秀珠,蔡妙英.常见细菌系统鉴定手册[M].北京:科学出版社,2001.
- [5] Quan CS, Liu Q, Tian WJ, et al. Biodegradation of an endocrine-disrupting chemical, di-2-ethylhexyl phthalate, by *Bacillus subtilis* No.661[J].Appl Microbio Biotech, 2005,66:701-7101.
- [6] Oleg NR, Christina D, Johan M, et al. Taxonomic characterization and plant colonizing abilities of some bacteria related to *Bacillus amyloliquefaciens* and *Bacillus subtilis*[J]. FEMS Microbiology Ecology, 2004,48:249-259.
- [7] 郭春雷,彭谦.高温菌研究进展[J].生物学杂志,2003,20(4):1-3.
- [8] 连宾,张永玲,任铁,等.茅台酒曲嗜热细菌的研究[J].贵州科学,1993,11(1):75-81.
- [9] 庄名扬.中国白酒香味物质形成机理及酿酒工艺的调控[J].酿酒,2007,34(2):109-113.
- [10] 陈晓月,金宁一,邹伟,等. β -半乳糖苷酶在枯草芽孢杆菌中的分泌表达[J].中国生物工程,2008,28(5):111-115.
- [11] 高学文,姚仕义,Huong Pham,等.枯草芽孢杆菌 B2 菌株产生的抑菌活性物质分析[J].中国生物防治,2003,19(4):175-179.
- [12] 牛丹丹,石贵阳,王正祥.分泌高效蛋白的地衣芽孢杆菌及其工业应用[J].生物技术通报,2009,(6):45-50.
- [13] 燕红,杨谦.地衣芽孢杆菌对麦麸降解作用的研究[J].林产化学与工业,2007,27(4):97-102.
- [14] 邵长军,李刚,李亮,等.白酒香型与香味成分探究[J].酿酒科技,2005,(8):92-93.
- [15] 黄虎翔,王辉.解淀粉芽孢杆菌对婴幼儿潜在致病性的研究[J].临床儿科杂志,2010,28(2):190-192.