

从曲样中分离霉菌及其 Biolog 微生物系统分析鉴定

廖永红,任文雅,沈 晗

(北京工商大学化学与环境工程学院,北京 100048)

摘 要: 利用稀释平板法从曲样中分离获得 3 株霉菌 1[#]、2[#] 和 3[#],对其形态观察和 Biolog 微生物系统鉴定,确定 3 株菌分别为:1[#] 菌为栖土曲霉(*Aspergillus terricola* Marchal), 2[#] 菌为寄生曲霉(*Aspergillus parasiticus* Speare), 3[#] 菌为杂色曲霉(*Aspergillus versicolor*)。各菌种对 Biolog96 孔碳源利用有显著差异,同一菌种不同时间对 Biolog96 孔碳源利用也有差异,分析得出曲霉主要利用 D-核糖、D-木糖。

关键词: 微生物; 曲霉; 分离; Biolog 微生物系统鉴定

中图分类号:Q93-3;TS261.1

文献标识码:A

文章编号:1001-9286(2009)09-0020-03

Isolation of *Aspergillus* from Starter Samples & Its Identification by Biolog Microbe System

LIAO Yong-hong, REN Wen-ya and SHEN Han

(College of Chemical and Environmental Engineering, Beijing Technology and Business University, Beijing 100048, China)

Abstract: Three *Aspergillus* strains including 1[#], 2[#] and 3[#] were isolated from starter single colony samples by dilution-plate method. The three strains were identified as *Aspergillus terricola* Marchal (1[#] strain), *Aspergillus parasiticus* Speare (2[#] strain), and *Aspergillus versicolor* (3[#] strain) by Biolog microbe system identification and morphologic observation. All the obtained strains must be under cool and dry storage. There was evident significance in the use of Biolog96 porous carbon source for different strains and for the same strains at different time. The analytic results showed that *Aspergillus* mainly used D-ribose and D-xylose.

Key words: microbe; *Aspergillus*; isolation; Biolog microbe identification system

酒曲中含有根霉、毛霉、犁头霉和酵母菌等多种微生物,其提供了酿造所需要的多种微生物混合体系^[1-2],霉菌在酿造工业上的广泛应用,早为世人熟知^[3]。微生物在曲块上生长繁殖时,分泌出各种水解酶,正是这些酶系使曲具有液化、糖化和蛋白分解等能力。酿造过程中,菌种所分泌的这些酶系共同作用于发酵原料,而最重要的是蛋白酶和淀粉酶。其中,曲霉是活性较强的蛋白酶,采用不同的曲霉制曲,产物的风味和营养也不同,对产品的香型和质量也会产生重要影响。因此,对酒曲中的霉菌进行种属鉴定将对产品的香型风格和营养质量起着重要作用。

Biolog 微生物自动分析系统是美国 Biolog 公司从 1989 年开始推出的一套微生物鉴定系统^[4],可以鉴定包括细菌、酵母、丝状真菌在内的近 2000 种微生物。Biolog 微生物自动鉴定系统能利用计算机进行数据分析,自动化和标准化程度高,鉴定范围大、速度快,目前已成为微生物分类鉴定常用的技术手段。

本试验将酒曲中的曲霉进行分离培养,然后利用 Biolog 微生物自动鉴定系统对分离得到的菌株进行分类学鉴定,初步探讨 Biolog 鉴定系统在酒曲霉菌鉴定中的应用,为酒曲中的微生物分析奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 原料

曲粉:某酿酒企业生产大曲。

1.2 主要试剂和仪器

接种液;浊度计(Biolog 公司);FF 接种板(Biolog 公司);Biolog 微生物仪(美国 Biolog 公司);130 s 型超净工作台;北京赛博伯乐实验技术有限公司。

1.3 培养基

马铃薯葡萄糖培养基、察氏培养基、牛肉膏蛋白胨培养基、麦芽汁培养基^[5-6]。

Biolog 鉴定用麦芽汁培养基:2%麦芽汁,2%琼脂,冷却后调整 pH 值至 5.5±0.2 (28℃),于 121℃灭

基金项目 国家基础科技平台项目 工业微生物菌种资源标准化整理、整合及共享试点项目(2005DKA21204-07)。

收稿日期:2009-07-29

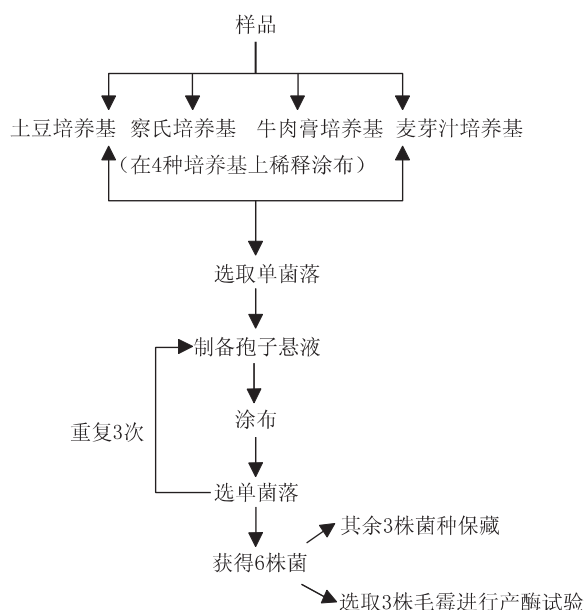
作者简介:廖永红(1965-),女,四川自贡人,硕士,副教授,研究方向:食品与发酵工程技术开发与研究。

菌 15 min。

1.4 实验方法

1.4.1 曲霉的分离与纯化

曲霉的分离纯化过程:



无菌条件下,将曲捣碎,称取适量样品,选取适宜的稀释度用生理盐水稀释,以涂布平板法分别涂于马铃薯葡萄糖培养基、察氏培养基、牛肉膏蛋白胨培养基、麦芽汁培养基平板上,35℃培养48 h,检查菌落出现情况。取单菌落,用接种针挖掘一小块菌丝移植于另一平板培养基上,35℃培养72 h,再从长有单菌落的平板中选取典型的曲霉菌落,取孢子制成悬液,涂布培养、镜检,重复培养2~3次以分离纯化曲霉。将纯化得的曲霉转接到察氏培养基试管斜面上培养,待生长完好后置于4℃冰箱中保存。

1.4.2 Biolog 微生物鉴定^[7]

按照 Biolog 微生物自动分析系统的标准,对从样品中分离得的1[#]、2[#]、3[#]菌种进行微生物鉴定,分析菌种利用C源的情况。

1.4.2.1 样品的纯化与制备

将察氏培养基冷却后倒入小平板中(大约10 mL)。放置到28℃的培养箱中培养48 h,以确定平板没有被污染。然后采取点植法将菌种点到察氏培养基平板进行活化培养。

挑取斜面上的菌,采用点植法,进行培养,培养时间48 h,培养温度28℃。

1.4.2.2 鉴定方法

① 浊度调整。关闭电源,调整指针至“0”刻度;擦净空白接种液管外壁,置于浊度计中,接通电源,用无菌水调整指针至100%。

② 菌悬液制备。取无菌棉签在接种液中蘸湿,将棉签在菌落表面转动,粘取菌体,注意不要带出培养基。倾斜

接种液管并沿内壁转动棉签,使菌体附着在内壁上,同时将菌体均匀打散。通过添加菌体或空白接种液调整浊度值,使其在相应标准浊度值的±2%范围内。由于标准管中不是水,所以调整浊度时要十分小心。使用浊度标准管调整至标准浊度值(70±2)%。

③ 接种微平板。将已经调整好浊度的菌液,用100 μL的移液枪很仔细地接种到 Biolog 鉴定板上,放置在装离心管的长盒中,并在盒的底部铺上吸水纸,以保持一定的湿度。

④ 微平板读数。FF 微平板读数时间分别为:0 h,微平板培养时间分别为24 h、48 h、72 h、96 h、120 h、144 h和168 h。

Biolog Microstation 系统会自动检索并读取数据,同时给出最匹配的10个ID名称。

1.4.3 菌种保藏

对所得菌种采用真空冷冻干燥法保藏^[8]。将装有菌悬液的安瓿管直接放在低温冰箱中(-80℃)或放在干冰无水乙醇浴中进行预冻。然后置于真空干燥箱中,开动真空泵进行真空干燥,最后将安瓿管封口置于冰箱(5℃左右)中或室温下避光保存。干燥后样品呈白色疏松状态。

2 结果与分析

2.1 菌种的分离与纯化^[9]

样品稀释后在马铃薯葡萄糖培养基、察氏培养基、牛肉膏蛋白胨培养基、麦芽汁培养基上培养,发现土豆培养基上主要为酵母菌和霉菌,其中霉菌主要是毛霉、根霉、曲霉;麦芽汁培养基上有较多的酵母菌生长;在察氏培养基上主要为霉菌;从4种培养基平板中共分离出6株霉菌,对其中3株毛霉进行研究,依次编号为1[#]、2[#]和3[#]。

2.2 Biolog 微生物自动分析系统鉴定菌种^[10]

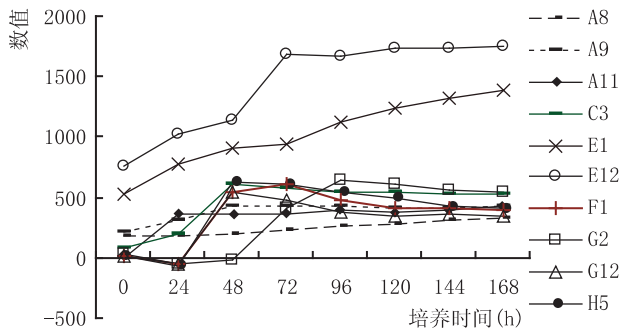
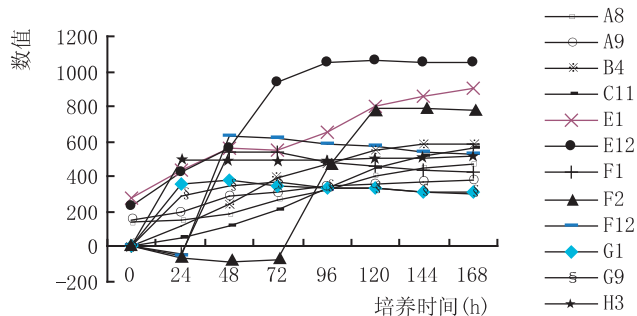
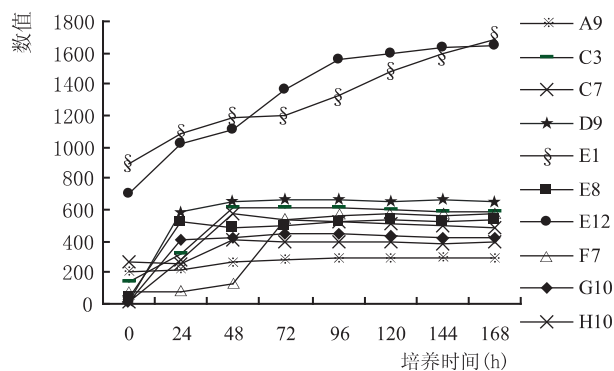
3株菌按照1.4.2的方法进行 Biolog 微生物系统鉴定。通过对24 h、48 h、72 h、96 h、120 h、144 h和168 h的Probability (PROB),相似性 Similarity (SIM) 和位距 Distance (DIS)分析,结果见表1。

表1 Biolog 微生物自动分析系统鉴定结果

菌号	鉴定结果
1 [#]	栖土曲霉(<i>Aspergillus terricola</i> Marchal)
2 [#]	寄生曲霉(<i>Aspergillus parasiticus</i> Speare)
3 [#]	杂色曲霉(<i>Aspergillus versicolor</i>)

结果显示几株菌属于曲霉^[11-13],同分离纯化结果相同。考察各株菌在0~168 h对FF平板上C源的利用,结果见图1~图3(图1、图2和图3中的字母编号代表了FF平板上不同碳源的位置)。

从所有碳源中,选择菌种利用最高的10种进行作图分析。3种菌虽然对D-核糖、D-木糖的利用率较高,但达到最高峰的时间却不同。1[#]菌、2[#]菌、3[#]菌分别在72 h、96 h和90 h达到最大值。另外,在同一时间点的数值也

图 1 1[#] 菌对 C 源的利用情况图 2 2[#] 菌对 C 源的利用情况图 3 3[#] 菌对 C 源的利用曲线

不同。96 h 时,1[#] 菌、2[#] 菌、3[#] 菌分别为 1700、1100 和 1600。

1[#] 菌对 D-核糖、D-木糖的利用率最高,对其他碳源的利用在 48 h 左右达到最高,此后一段时间基本保持稳定。2[#] 菌虽然对 D-核糖、D-木糖的利用率也很高,但对其他碳源的利用也随时间的延长呈上升趋势,利用比较平均。3[#] 菌的情况和 1[#] 菌基本相同,但是利用碳源的种类存在差别。

168 h 时,1[#] 菌种、2[#] 菌种和 3[#] 菌种虽然都以 D-核糖、D-木糖、溴代丁二酸为主要碳源,但 1[#] 菌种对 α -甲基-D-半乳糖苷利用率高于 2[#]、3[#] 菌种,而 3[#] 菌种对 D-松三糖的利用率高于 1[#]、2[#] 菌种。

D-核糖广泛应用于医药、食品、化妆品和饲料工业等领域。在食品工业上,D-核糖可用来合成多种呈味物质。天然 D-木糖是以多糖的形态存在于植物中。因为它

们特别在农产品的废弃物(例如玉米的穗轴、秸秆、棉桃的外皮等)中含量很多,所以是经济廉价的原料。

由此得出,菌种对碳源的利用随生长时间的变化而改变。各个菌种所利用的碳源种类不同,在同一时间下对相同碳源的利用率也有差别,菌种的来源以及不同生长阶段都会影响对碳源的利用。

3 结论

3.1 利用平板分离法从曲粉中分离出 3 株菌,对菌株的 Biolog 鉴定结果为:1[#] 菌为栖土曲霉(*Aspergillus terricola* Marchal),2[#] 菌为寄生曲霉(*Aspergillus parasiticus* Speare),3[#] 菌为杂色曲霉(*Aspergillus versicolor*)。

3.2 通过分析 1[#] 菌株、2[#] 菌株和 3[#] 菌株对 Biolog96 孔碳源利用情况,得出菌种对碳源的利用随生长时间的变化而改变。各菌种所利用的主要碳源虽然相同,但是对其他碳源的利用存在差异。例如 1[#] 菌种还可以利用 α -甲基-D-半乳糖苷,2[#] 菌种可以利用 D-松三糖,3[#] 菌种可以利用麦芽糖、癸二酸等。同一时间下菌种对相同碳源的利用率不同,菌种的来源以及不同生长阶段都会影响对碳源的利用。

参考文献:

- [1] 郭来虎.中国第一窖[M].北京:中国工人出版社,1999.
- [2] 林祖申.UE336-2 米曲霉应用于酱油生产的研究[J].中国酿造,2003,(4):24-26.
- [3] 钱存柔,黄仪秀.微生物学实验教程[M].北京:北京大学出版社,1999.
- [4] 姚粟,程池,李金霞,等. Biolog 微生物自动分析系统-丝状真菌鉴定操作规程的研究[J]. 生产与科研经验,2006,32(8):63-67.
- [5] 陈天寿.微生物培养基的制造与应用[M].北京:中国农业出版社,1995. 67-70.
- [6] 周德庆.微生物学实验手册[M].上海:科学技术出版社,1986, 58-361.
- [7] 张朝华. Biolog 细菌自动鉴定系统的应用[J]. 中国进出口动植物检疫,1994,(3):30-32.
- [8] 顾金刚.微生物菌种资源收集、整理、保藏技术规程[M].北京:中国农业出版社,2005.20-56.
- [9] 鲁迎新,高进秀,刘志成.酱油曲霉优良菌株的评选[J]. 中国调味品,1993,(7):7-10.
- [10] Alexander M.Blinkovsky,Tony Byun,Kimberly M.Brown,and Elizabeth J.Golightly. Purification,characterization,and heterologous expression in *fusarium venenatum* of a novel serine carboxypeptidase from *Aspergillus oryzae*[J].Applied and Environmental Microbiology,August 1999,65(8): 3298-3303.
- [11] 杜连祥.工业微生物学实验技术[M].天津:天津科学技术出版社,1992. 236-237.
- [12] 齐祖同.中国真菌志[M].北京:北京科学出版社,1997,82-86.
- [13] 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,1997. 205-209.