

高温大曲中微生物的分离与鉴定

刘效毅¹, 郭坤亮¹, 辛玉华²

(1. 贵州大学生命科学学院, 贵州 贵阳 550025; 2. 中国科学院微生物所, 北京 100101)

摘要: 采用传统分离培养方法和现代分子生物学方法, 对酱香型白酒高温大曲中微生物的多样性进行研究分析。从酱香型白酒高温大曲中分离出 147 株微生物, 其中 97 株为细菌, 包括芽孢杆菌、放线菌、葡萄球菌、微球菌 4 类; 50 株霉菌, 包括青霉、曲霉、毛霉、交链孢霉、茎点霉、球毛壳、散囊菌、红曲霉 8 类, 研究结果表明, 高温大曲中的微生物具有高度的多样性。

关键词: 酒曲; 微生物; 鉴定; 生理生化特性; 16S rRNA 基因; ITS

中图分类号: Q93-3; TS261.1; Q78

文献标识码: A

文章编号: 1001-9286(2012)06-0052-04

Separation and Identification of Microbes from High-temperature Daqu

LI Xiaoyi¹, GUO Kunliang¹ and XIN Yuhua²

(1. Life Science College of Guizhou University, Guiyang, Guizhou 550025; 2. Microbiology Research Institute, CAS, Beijing 100101, China)

Abstract: The diversity of microbes in high-temperature Maotai-flavor Daqu was analyzed by traditional separation and culture method and modern molecular biological method. 147 microbial strains were separated successfully, among them, 97 strains were bacteria including *Bacillus*, *Actinomycetes*, *Staphylococcus*, and *Micrococcus*, and the other 50 strains were mould including *Penicillium*, *Aspergillus fumigatus*, *Mucor*, *Alternaria*, *Phoma*, *Chaetomium globosum*, *Eurotium*, and *Monascus*. The research results further proved the diversity of microbes in high-temperature Daqu. (Tran. by YUE Yang)

Key words: starter; microbes; identification; physiological and physiochemical characteristics; 16S rRNA gene; ITS

茅台酒是高温大曲酱香型白酒的典型代表, 以用曲量大, 制曲温度高为特点。“曲是酒之骨”, 酒曲的好坏直接影响着酒的产量和质量。研究发现, 高温曲是一种高温细菌酒曲^[1], 其发酵温度可高达 65℃^[2], 酒曲中以芽孢杆菌最多, 霉菌含量很少, 基本上无酵母菌^[3]。这些微生物在育种、酿酒、酶制剂、乳酸生产等方面具有重要作用, 因此研究酒曲中的微生物具有重要意义。本研究利用传统的分离培养方法和分子生物学方法相结合, 对高温大曲中的微生物进行了分离鉴定。

1 材料与方法

1.1 材料

菌种来源: 传统酱香型白酒高温大曲, 具体试验样品见表 1。

培养基: 细菌采用 PYG 培养基; 霉菌采用 PDA 培养基。

1.2 实验方法

1.2.1 菌株的分离

采用倍比稀释法对酒曲中的微生物进行分离培养。

表 1 实验菌种来源样品及其编号

菌种	黄曲	白曲	黑曲	成品曲
细菌 (37℃)	LHGX1	LBQX2	LHGX3	LCQX4
细菌 (42℃)	HGX1	BQX2	HGX3	CQX4
霉菌 (28℃)	HQM1	BQM2	HQM3	CQM4
霉菌 (42℃)	HHQM1	HBQM2	HHQM3	HCQM4

细菌分别在 37℃ 和 42℃ 下培养 1~3 d, 计数; 霉菌分别在 28℃ 和 42℃ 下培养 5~7 d, 计数。

1.2.2 DNA 的提取和扩增

采用细菌基因组 DNA 小量快速提取试剂盒 (博大泰克公司) 提取细菌 DNA; 采用植物基因组 DNA 提取试剂盒 (TIANGEN 公司) 提取霉菌 DNA。采用细菌 16S rRNA 基因序列通用引物 27F 和 1492R 扩增细菌 16S rRNA 基因序列; 采用真菌 ITS 序列通用引物 ITS4 和 ITS5 扩增霉菌 ITS 序列。

1.2.3 芽孢杆菌 *gyrB* 基因的扩增

扩增引物: UP-1: 5'-GAAGTCATCATGAC-CGTTCTGCA(TC)GC(TCAG)GG(TCAG)GG(TCAG)AA(AG)TT(TC)GA-3'; UP-2r: 5'-AGCAGGGTACGGAT-

收稿日期: 2012-03-22; 修回日期: 2012-03-26

作者简介: 刘效毅 (1985-), 男, 在读硕士, 研究方向: 应用微生物学。

通讯作者: 郭坤亮, 男, 高级工程师, E-mail: guokunlang@sohu.com; 辛玉华, 女, 高级工程师, E-mail: xinyh@im.ac.cn。

GTGCGAGCC (AG)TC (TCAG)AC (AG)TC(TCAG)GC (AG)TC(TCAG)GTCAT-3'。

测序引物:UP-1S:5'-GAAGTCATCATGAC-CGTTCTGCA-3';UP-2Sr:5'-AGCAGGGTACGGATGT-GCGAGCC-3'。

PCR 扩增条件:95 °C 使 DNA 预变性 5 min;然后进入 30 个循环:95 °C 使 DNA 变性 1 min,52 °C 引物退火 1 min,72 °C 延伸 1.5 min;最后 72 °C 延伸 5 min。

1.2.4 序列分析

将获得的基因序列导入美国 NCBI 网站的 Blastn 在线软件,选择 Nucleotide Collection(nr/nt)数据库,运行 Blastn 程序,获取基因序列同源性最高的菌群。

1.2.5 鉴定方法

细菌的鉴定根据 16S rRNA 基因序列比对结果并结合文献[4-6]的方法进行;霉菌的鉴定根据 ITS 序列比对结果并结合文献[7-9]的方法进行。

2 结果与分析

2.1 平板培养计数

按实验设计在不同温度条件下进行培养,考察不同曲中的微生物结构,结果见表 2。

表 2 不同温度下微生物培养数量 (个/g 曲)

菌类	黄曲	白曲	黑曲	成品曲
细菌(37 °C)	3.17×10 ⁷	2.3×10 ⁷	7.5×10 ⁶	1.06×10 ⁷
细菌(42 °C)	4.4×10 ⁷	5.33×10 ⁷	8.3×10 ⁶	1.225×10 ⁷
霉菌(28 °C)	1.51×10 ⁶	1.75×10 ⁴	8.91×10 ⁶	5.17×10 ⁶
霉菌(42 °C)	少见	少见	少见	少见

从表 2 可以看出,细菌在酒曲中的数量较大,并且不同温度下数量变化不大;而霉菌在不同的温度下数量变化较大;不同酒曲之间微生物总量变化不大,而细菌、霉菌间变化明显,其中黑曲与其他酒曲间细菌的数量变化最明显;白曲与其他酒曲间霉菌的数量变化最明显。

2.2 细菌 16S rRNA 基因序列和真菌 ITS 序列比对

经 BLAST 比对后发现细菌主要为芽孢杆菌、放线菌、葡萄球菌和微球菌,其中芽孢杆菌占绝大部分;霉菌主要为青霉、曲霉、毛霉、球毛壳、交链孢霉、散囊菌和茎点霉菌。

2.3 芽孢杆菌 *gyrB* 基因的鉴定结果及典型芽孢杆菌菌株生理生化鉴定

87 株芽孢杆菌经 *gyrB* 基因鉴定后,确定的芽孢杆菌共有 7 个种,其中解淀粉芽孢杆菌 47 株,坚强芽孢杆菌 5 株,枯草芽孢杆菌 7 株,地衣芽孢杆菌 17 株,巨大芽孢杆菌 7 株,*Bacillus sonorensis* 3 株,*Bacillus flexus* 1 株。菌株生理生化实验结果见表 3。

将菌株特征与《伯杰氏系统细菌学手册》中的标准菌

表 3 7 株典型芽孢杆菌菌株生理生化鉴定

指标	HQX 1.1	HQX 1.19	BQX 2.10	BQX 2.11	CQX 4.8	LHGX 1.1	HQX 3.6
革兰氏染色	+	+	+	+	+	+	+
接触酶	+	+	+	+	+	+	+
淀粉酶	+	+	+	+	+	+	+
蛋白酶	+	+	+	+	+	+	+
V. P	+	-	+	+	+	-	+
硝酸盐还原	+	+	+	+	+	-	+
柠檬酸盐利用	+	-	+	-	+	+	+
葡萄糖产酸	+	+	+	+	+	+	+
L-阿拉伯糖产酸	-	-	+	-	+	+	+
D-木糖产酸	+	-	+	-	+	+	+
甘露醇产酸	+	+	+	+	+	+	+
乳糖产酸	+	+	+	+	+	+	+
明胶液化	+	+	+	+	+	+	+
pH5.7 生长	+	-	+	+	+	+	+
7 % NaCl 生长	+	+	+	+	-	+	+

注: +, 能利用或反应; -, 不能利用或反应。

株对照,并结合 16S rRNA 基因和 *gyrB* 基因的比对结果,鉴定出菌株 HQX1.1 为解淀粉芽孢杆菌;菌株 HQX1.19 为坚强芽孢杆菌;菌株 BQX2.10 为地衣芽孢杆菌;菌株 BQX2.11 为枯草芽孢杆菌;菌株 CQX4.8 为 *Bacillus sonorensis*;菌株 LHGX1.1 为 *Bacillus flexus*;菌株 HQX3.6 为巨大芽孢杆菌。

2.4 放线菌类的鉴定

与菌株 LBQX2.10 16S rRNA 基因序列同源性 99 % 以上的放线菌为 *Actinobacterium*、*Streptomyces tendae*、*Streptomyces violaceorubidus*、*Streptomyces collinus*、*Streptomyces lienomycini*、*Streptomyces globisporus*、*Streptomyces tritolerans* 和 *Streptomyces fradiae*;与菌株 LBQX2.9、LHGX3.1 和 LHGX3.1 16S rRNA 基因序列同源性 99 % 以上的放线菌为 *Saccharopolyspora hordei* 和 *Saccharopolyspora hirsuta*;表 4 为其鉴定结果,表 5 为生理生化特征结果。

将菌株特征与《放线菌的分类和鉴定》中的标准菌株对照,并结合 16S rRNA 基因的比对结果,鉴定出菌株 LBQX2.9、LHGX3.1 和 LHGX3.2 为 *Saccharopolyspora hirsuta*;菌株 LBQX2.10 为 *Streptomyces fradiae*。

2.5 其他属细菌的鉴定

与菌株 BQX2.3、BQX2.18、CXQ4.13 和 CXQ4.14 的 16S rRNA 基因序列同源性在 99 % 以上的细菌为葡萄球菌、腐生葡萄球菌和表皮葡萄球菌;与菌株 LHGX1.9 和 LCQX4.1 16S rRNA 基因序列同源性在 99 % 以上的细菌为微球菌、藤黄微球菌、和土微球菌。表 6 为其生理生化鉴定结果。

将菌株特征与《伯杰氏系统细菌学手册》中的标准菌株对照,并结合 16S rRNA 基因序列的比对结果,鉴定

表4 培养基形态描述

项目	高氏培养基	桑塔氏培养基	察氏培养基	葡萄糖天冬素	ISP-2	ISP-3	ISP-4	ISP-5
LBQX2.9								
气生菌丝	淡黄	白色	棕红	白色	浅白	浅黄	白色	白色
基内菌丝	棕红	淡黄	棕红	浅橙	浅橙	浅红	白色	白色
可溶性色素	无	无	无	无	无	无	无	无
LBQX2.10								
气生菌丝	淡红	粉红	微黄	白色	白色	灰粉	淡粉	白色
基内菌丝	黄褐	黄褐	无色	浅黄	黄褐	黄褐	黄褐	白色
可溶性色素	无	无	无	无	无	无	无	无
LHQX3.1								
气生菌丝	淡黄	白色	棕红	白色	浅白	浅黄	白色	白色
基内菌丝	棕红	淡黄	棕红	浅橙	浅橙	浅红	白色	白色
可溶性色素	无	无	无	无	无	无	无	无
LHQX3.2								
气生菌丝	淡黄	白色	棕红	白色	浅白	浅黄	白色	白色
基内菌丝	棕红	淡黄	棕红	浅橙	浅橙	浅红	白色	白色
可溶性色素	无	无	无	无	无	无	无	无

表5 生理生化特征

项目	LBQX2.9	LBQX2.10	LHQX3.1	LHQX3.2
菌丝	柔直、有分枝	螺旋	柔直、有分枝	柔直、有分枝
孢子	圆形	椭圆	圆形	圆形
蛋白酶	-	-	-	-
淀粉酶	+	+	+	+
硝酸盐还原	-	-	-	-
明胶液化	+	+	+	+

注: +, 能利用或反应; -, 不能利用或反应。

出菌株 BQX2.3、BQX2.18 和 CQX4.14 为腐生葡萄球菌; 菌株 CQX4.14 为表皮葡萄球菌; 菌株 LHQX1.9 和 LCQX4.1 为藤黄微球菌。

2.6 霉菌的鉴定

根据 ITS 序列鉴定结果及其形态特征鉴定了 20 株

典型的菌株, 其鉴定结果如下:

与菌株 HQM1.1 ITS 基因序列同源性达 100 % 的菌株为 *Alternaria*。该菌菌丝生长较慢, 菌落形状不规则, 有匍匐菌丝, 菌丝中间有横隔, 孢子较小, 为倒棒状, 顶端延长成喙状, 淡褐色, 呈有分支的链状排列, 鉴定其为交链孢霉。

与菌株 HQM1.2 ITS 基因序列同源性达 100 % 的菌株为 *Phoma*。该菌菌丝生长较慢, 菌落较小, 生长初期为白色, 后期为灰白色, 菌落反面为红色, 有分生孢子器, 孢子较小, 为棒状, 链状排列, 鉴定其为茎点霉菌。

与菌株 HQM1.3、BQM2.4、HQM3.6 和 CQM4.3 ITS 基因序列同源性达 100 % 的菌株为 *Chaetomium globosum*。这 4 株菌菌丝生长较慢, 有气生菌丝, 菌落有灰色的边缘, 边缘从灰色变为黑色。菌丝中间有隔, 有球形的子囊壳, 鉴定其为球毛壳。

与菌株 HQM1.4 ITS 基因序列同源性达 99 % 以上的菌株为 *Monascus*, 该菌菌落质地为絮状, 厚度中等, 有辐射状沟纹, 表面初期为白色, 后期呈现淡红色, 菌落反面开始为黄色, 后期变为红褐色。菌丝体有横隔, 多分枝, 分枝顶端生有孢子, 孢子量较少, 孢子为球形, 产孢结构为双层, 鉴定其为红曲霉。

与菌株 HQM1.6 ITS 基因序列同源性达 100 % 的菌株为 *Aspergillus insuetus*。该菌菌落平坦, 有辐射状沟纹, 质地呈絮状, 边缘整齐, 生长初期为白色, 后期变为褐黑色, 菌落反面为黄褐色, 菌丝中间有横隔, 顶端形成顶囊, 有大量的孢子, 孢子为球形, 鉴定其为焦曲霉。

与菌株 BQM2.1 ITS 基因序列同源性达 100 % 的菌株为 *Mucor racemosus*。该菌菌丝生长较快, 菌落较大, 菌

表6 生理生化特征

指标	BQX2.3	BQX2.18	CQ4X.13	CQX4.14	LHQX1.9	LCQX4.1
菌落	白色、圆形	白色、圆形	白色、圆形	白色、圆形	黄色、圆形	黄色、圆形
革兰氏染色	+	+	+	+	+	+
接触酶	+	+	+	+	+	+
淀粉酶	-	-	-	-	+	+
蛋白酶	+	+	+	+	+	+
V.P	+	+	+	+	-	-
硝酸盐还原	+	+	+	+	-	-
柠檬酸盐利用	-	-	-	-	+	+
葡萄糖产酸	+	+	+	+	+	+
L-阿拉伯糖产酸	-	-	+	+	-	+
D-木糖产酸	-	+	-	-	-	-
甘露醇产酸	+	-	-	+	-	-
乳糖产酸	+	+	+	-	+	-
蔗糖产酸	+	+	+	-	-	-
麦芽糖产酸	+	-	+	+	-	-
甘油产酸	+	+	+	+	-	-
明胶液化	+	+	+	+	+	+

注: +, 能利用或反应; -, 不能利用或反应。

落质地丝绒状,边缘不整齐,生长初期为白色,后期变为浅灰色;菌落反面为淡黄色,菌丝中间无横隔,包囊梗总状分枝,孢子呈球形,鉴定其为总状毛霉。

与菌株 BQM2.3、HQM3.2 和 CQM4.4 ITS 基因序列同源性达 99 % 以上的菌株为 *Penicillium*。这 3 株菌落平坦,边缘整齐,菌落中央有少量渗出液,生长初期为白色,有气生菌丝,菌丝中间有隔,菌丝顶端有帚状枝,孢子呈球形,鉴定其为青霉。

与菌株 HQM3.1 ITS 基因序列同源性达 99 % 以上的菌株为 *Aspergillus oryzae*。该菌菌丝生长较快,质地丝绒状,中央呈现絮状,生长初期为白色,后期为褐色,菌落反面无色,分生孢子头为放射状,顶囊为球形,分生孢子为球形,产孢结构单层,鉴定其为米曲霉。

与菌株 HQM3.4 和 HQM3.5 ITS 基因序列同源性达 100 % 的菌株为 *Aspergillus flavus*。这 2 株菌菌丝生长较快,质地丝绒状,中心有凸起,有放射状沟纹,边缘不整齐;菌落正面为黄色,反面中部褐色;分生孢子头为放射状,顶囊为球形,分生孢子较多,呈椭圆形,产孢结构为单层,鉴定其为黄曲霉。

与菌株 CQM4.1 和 CQM4.6 ITS 基因序列同源性达 100 % 的菌株为 *Penicillium oxalicum*。这 2 株菌落平坦,边缘整齐,质地绒状,生长初期为白色,后期变为灰绿色,背面无色,孢子易脱落,菌丝较细,无色,有隔膜,分生孢子梗顶端形成帚状枝,分生孢子呈椭圆形,鉴定其为草酸青霉。

与菌株 CQM4.2 和 CQM4.5 ITS 基因序列同源性达 100 % 的菌株为 *Eurotium amstelodami*。这 2 株菌丝生长较慢,菌落较小,营养菌丝上有螺旋状产囊体,有球形子囊果;产孢结构为单层,孢子较大,呈球形,有小刺,鉴定其为散囊菌。

与菌株 HBQM2.1 ITS 基因序列同源性达 100 % 的菌株为 *Rhizomucor pusillus*。该菌菌落形态不规则,生长初期为白色,后变为灰色,菌丝中间无隔,有分枝,菌丝体上有包囊梗,包囊梗总状分枝,囊内有球形的孢子,鉴定

其为微小根毛霉。

3 讨论

从高温大曲中分离出的 147 株微生物中,细菌占 97 株,霉菌占 50 株,其中 97 株细菌共鉴定出 12 个种类,包括解淀粉芽孢杆菌、坚强芽孢杆菌、枯草芽孢杆菌、地衣芽孢杆菌、巨大芽孢杆菌、*Bacillus sonorensis*、*Bacillus flexus*、*Saccharopolyspora hirsuta*、*Streptomyces fradiae*、腐生葡萄球菌、表皮葡萄球菌和藤黄微球菌,体现出高温大曲中细菌的多样性;其中 87 株为芽孢杆菌,占细菌总数的绝大部分,这与高温大曲制曲过程中的高温发酵密切相关,发酵过程中,温度可高达 65 ℃,绝大多数不耐高温的细菌死亡,只存活耐高温的细菌,主要是能产生芽孢的芽孢杆菌。50 株霉菌中共鉴定出 12 个种类,包括交链孢霉、茎点霉菌、球毛壳、红曲霉、焦曲霉、总状毛霉、青霉、米曲霉、黄曲霉、草酸青霉、散囊菌和微小根毛霉,体现出酒曲中霉菌的多样性。

参考文献:

- [1] 熊子书.中国三大香型白酒的研究(二)酱香·茅台篇[J].酿酒科技,2005(4):252-311.
- [2] 杨代永,范光先,汪地强,吕云怀.高温大曲中的微生物研究[J].酿酒科技,2007(5):37-41.
- [3] 黄永光,黄旭,黄平.茅台酒酿酒极端环境与极端酿酒微生物[J].酿酒科技,2006(12):47-50.
- [4] 刘桂君,朱婷婷,等.清香大曲及酒醅中地衣芽孢杆菌的分离鉴定[J].酿酒科技,2010(1):31-38.
- [5] John G.Holt, Williams & Wilkins, Baltimore. Bergey's manual of systematic bacteriology [M]. Springer, 2004.
- [6] 阎逊初.放线菌的分类和鉴定[M].上海:科学出版社,1992.
- [7] 齐祖同.中国真菌志第五卷曲霉属及其相关有性型[M].上海:科学出版社,1997.
- [8] 孔华中.中国真菌志第七卷青霉属及其相关有性型[M].上海:科学出版社,2007.
- [9] Domsch, Gams & Anderson. Compendium of Soil Fungi [M]. IHW-Verlag, 1993.

河南酒业年度大奖揭晓

本刊讯 据《华夏酒报》报道,2012 年 4 月 27 日,由河南省酒业协会举办的“2011 河南酒业年度大奖”颁奖典礼在河南郑州隆重举行。来自全省酒类行业的精英齐聚一堂。随着各大奖项的揭晓,为风起云涌的 2011 年河南酒业画上了圆满的句号。

河南省糖酒食品流通协会会长王庆云、河南省酒业协会会长熊玉亮荣获 2011 河南酒业功勋人物。宋河酒业股份有限公司董事长朱文臣、洛阳杜康控股有限公司总经理吴书青、仰韶酒业有限公司董事长侯建光、亿星实业集团有限公司董事长李士强等荣获 2011 河南酒业十大风云人物。河南省张弓酒业有限公司总经理孙西玉、民权九鼎葡萄酒有限公司总经理朱和平等人荣获 2011 河南酒业特殊贡献人物;飞天茅台、国窖 1573、宋河国字六号、酒祖杜康、仰韶彩陶坊、张裕葡萄酒等获 2011 河南市场最畅销酒品牌。

此外,本次评奖活动还评选出 2011 最受河南消费者信赖的酒品经销商、2011 河南市场最具创造力的酒类企业、2011 河南十大葡萄酒窖(行)、2011 河南十大酒品鉴会所等。一名获奖者评价说,这是河南省首次上规模的评选,获奖者均受到业内认可。(周晓文,小小祿)

来源 华夏酒报 2012-5-18