

窖泥己酸菌的分离培养与诱变选育

熊 俐, 胡 洋, 刘 俊, 袁 杰, 高 蛟

(四川理工学院生物工程学院, 四川 自贡 643000)

摘 要: 泥窖己酸菌产生的己酸是浓香型大曲酒主体香成分的前体物质之一。从老窖泥中分离纯化出一株产酸能力较高的己酸菌 GS₃, 以其为亲株, 通过紫外诱变(照射功率 15W, 照射距离 30cm, 时间为 3min), 筛选到 1 株产酸量提高 12% 的突变株 GSUT₃, 多次继代培养结果表明其产量稳定。研究还发现 GSUT₃ 与亲株之间, GSUT₃ 第 1 代与第 8 代之间, 其生长变化规律和己酸产量的变化规律表现一致。

关键词: 己酸菌; 泥窖; 分离纯化; 紫外诱变; 生长特性

中图分类号: TS262.3

文献标识码: A

浓香型大曲酒的泥窖中栖息着大量的微生物, 主要有乳酸菌、丁酸菌、己酸菌、甲烷菌、硫酸盐还原菌和硝酸盐还原菌等, 这对形成窖香浓郁、绵甜悠长的浓香型典型风格起着关键的作用。己酸菌是其中非常重要的产酸微生物, 它产生的己酸与大曲发酵产生的酒精生成己酸乙酯, 是浓香型大曲酒的主体香成分, 因此其生长代谢情况直接左右着酒醅的发酵质量及其产品质量的优劣^[1-2]。

己酸菌培养液可广泛应用于浓香型大曲酒的灌窖、窖池保养、人工窖泥培养和酯化液的制作等, 以改善和提高浓香型大曲酒的质量^[1]。本试验从自然老窖泥中分离、筛选出产酸能力较好的野生己酸菌株, 经紫外线照射和直接驯化, 希望能选育出优质高产的突变株, 为酒质改良提供微生物资源。

1 实验材料及方法

1.1 材料与试剂

材料: 窖泥(采自四川旭水集团酒业的老窖池)。试剂: 乙酸钠, 乙醇, 硫酸铵, 酵母膏, 硫酸镁, 硫酸钙, 磷酸二氢钾, 生物素, 氢氧化钠, 乙醚, 琼脂, 硫酸等。

1.2 仪器与设备

手提式压力蒸汽消毒器, 恒温培养箱, 显微镜, 超净工作台, 30W 紫外灯, 血球计数仪。

1.3 培养基的制备

乙酸钠改良培养基: 乙酸钠 5g, 酵母膏 1g, 4% 磷酸二氢钾 10mL, 2% 硫酸镁 5mL, 0.5% 硫酸钙 20mL, 5% 硫酸铵 10mL, 5mg/L 生物素 1mL, 自来水定容至 1000mL, pH 6.0 - 6.5, 于 0.1MPa 灭菌 30min, 接种前加乙醇 20mL。

固体乙酸钠改良培养基: 配置液体培养基, 添加 2% 琼脂, 融化后过滤分装于小三角瓶中, 高压灭菌, 使用前加 2% 乙醇。

固体斜面管培养基: 配置液体培养基, 添加 4% 琼脂, 融化后过滤分装(各 10mL)于小试管中, 高压灭菌, 冷却至 60℃左右时加入 2% 乙醇, 凝固后于真空干燥器中抽真空超过 0.08MPa。

1.4 己酸菌的分离纯化

基本流程: 窖泥 → 种子液的制备 → 富集培养 → 平板分离 → 斜面转接 → 显微镜观察(初筛) → 试管液体培养 → 血球计数板测定细胞数 → 三角瓶扩大培养 → 己酸的测定 → 筛选到生活力强、产能高的菌株。

己酸菌种子液的制备: 取 1g 优质窖泥, 放入液体培养基中, 80℃水浴处理 10min, 冷却后, 再加 2-3 滴无水乙醇封口, 加塞包扎, 33℃培养至产气为止, 得到己酸菌种子液。

富集培养: 吸取己酸菌种子液于乙酸钠改良培养基中, 80℃水浴处理 10min, 冷却后, 33℃培养 5d。

平板分离: 吸取己酸菌液, 取 $10^5 - 10^7$ 稀释度的培

养液各 1 mL 加入空培养皿中, 倒入融化保温的固体培养基, 待凝固后抽真空至 0.08MPa 于 33°C 培养 3d。

斜面转接: 挑取形态规则的菌落转接于培养基斜面, 抽真空, 于 33°C 培养 3-5d。

初筛: 选边缘整齐、光滑微凸的圆点型菌落, 挑取少许置于滴有无菌水的载玻片上, 显微镜下观察, 从中选择游动活泼、杆状和带有鼓锤状芽孢的菌株。

复筛: 从初筛菌株中挑取菌落少许于试管乙酸钠改良培养液中, 33°C 培养 7-10d 用血球计数板测定己酸菌细胞数, 从中挑选细胞数超过 1 亿个 /mL 的菌株, 进行三角瓶扩大培养, 检测发酵液的己酸含量, 挑选产量高的菌株作为诱变育种的亲株。

菌种保藏: 斜面培养基厌氧培养后冰箱保藏。

1.5 菌种的诱变

菌种的诱变: 从分离纯化所得的菌株中, 选择产酸量较高者作为出发菌, 在斜面培养基上培养至对数生长期, 收集细胞, 用生理盐水洗涤, 用缓冲液制成细胞悬液, 稀释至细胞数为 2×7^{10} 个, 取孢子悬液 5 mL, 置于直径为 90mm 的平板中, 垂直置于 15W 紫外灯下, 照射距离 30cm 左右, 照射时间为 1min-4min 然后吸取己酸菌液 1mL 加入空培养皿中, 倒入融化的固体培养基, 待凝固后抽真空至 0.08MPa 于 33°C 培养 3d。

筛选: 从经诱变处理的平板中, 随机挑取生长良好的单菌落多份, 分别接种到试管斜面上, 置于乙酸钠改良培养液中, 33°C 培养 7-10d 用血球计数板测定己酸菌细胞数, 从中挑选细胞数超过 1 亿个 /mL 的菌株为复筛菌株。检测复筛所得菌株发酵液的己酸含量, 选择出产酸能力明显高于出发菌的菌株, 再经分离培养, 继续驯化, 直至选出性能优良、遗传性状稳定的理想菌株。

1.6 分析检测

(1) 己酸含量的测定 (比色法): 利用发酵液中己酸与醋酸铜显色反应 (pH 6.8), 取乙醚层溶液, 用分光光度计在波长 660nm 下, 测定 O. D. 值, 绘制标准曲线, 对样品定量分析。

(2) 己酸菌产酸规律曲线的绘制: 菌株于乙酸钠改良培养液中, 33°C 培养 12d 每隔 1 天取样检测发酵液中的己酸含量, 根据结果绘制己酸含量变化的规律曲线。

(3) 己酸菌生长曲线的绘制 (镜检记数法): 菌株于乙酸钠改良培养液中, 33°C 培养 12d 每隔 1 天取样一次镜检。取 25 × 16 的计数板, 数四个角上 4 个大格, 再加上中央大格 (共 5 大格即 80 小格) 的细胞数。每个检样重复计数 3 次, 取平均值。检测液浓度应使细菌数在计数板中每小格含 4-5 个为宜。否则应将检测样重新稀释。根据检测结果绘制生长曲线。

(4) 正负突变的确定: 将己酸产量比亲株高 2% 以

上的突变株记为正突变, 反之小 2% 的记为负突变。

2 结果与分析

2.1 分离纯化培养

对窖泥中的己酸菌经过分离纯化培养和镜检, 初筛到 8 株游动活泼、带有鼓锤状芽孢的菌株, 分别编号为 GS₁₋₈, 进一步用比色法和绘制的己酸含量标准曲线 (回归方程: $y = 0.3366x + 0.656$ $R^2 = 0.9933$), 来测定各菌株发酵液己酸的含量, 从而确定其产酸能力。研究发现 (表 1) GS₅ 的产酸能力最强 (902.50 mg/100mL), 将其作为亲株进行紫外照射处理。

表 1 分离纯化所得己酸菌株的产酸量

菌株	己酸产量 /mg/100mL	菌株	己酸产量 /mg/100mL
GS ₁	548.65 ± 20.72	GS ₅	902.50 ± 17.42
GS ₂	863.78 ± 16.01	GS ₆	479.47 ± 23.11
GS ₃	633.34 ± 21.73	GS ₇	794.03 ± 17.96
GS ₄	787.734 ± 12.77	GS ₈	892.72 ± 21.88

2.2 紫外线处理时间对致死率和正突变率的影响

紫外诱变后, 将被处理液稀释涂平板, 计算菌落数。以亲株为对照, 计算致死率。有研究认为杀菌率在 70% - 80% 或更低, 诱变效果更好^[3]。本研究发现 (表 2) 紫外处理时间为 3min 时, 致死率为 68.3%, 比较接近这个范围, 因此将该处理组作为下一步的筛选对象。

从紫外处理 3min 的这一组的平板上随机挑选生长较大的菌落做进一步的初筛, 以亲株为对照, 根据己酸产量, 确定正负突变株, 结果初步筛选到 5 株正突变株, 正突变率为 8.33% (表 3)。

表 2 诱变时间与致死率

项目	菌落数 /cfu/L	致死率 %
对照	120	-
紫外处理 1min	100	12.0
紫外处理 2min	78	35.0
紫外处理 3min	38	68.3
紫外处理 4min	10	91.7

表 3 紫外诱变结果

总株数	正突变株数	负突变株数	正突变率 %	总突变幅度 %
60	5	4	8.33	15.0

2.3 突变株性能的研究

(1) 产酸能力

将突变株在改良液体乙酸钠改良培养基中培养 10d 后, 检测发酵液己酸含量。研究发现 (表 4) 突变株 GSUT₄ 和 GSUT₃ 的产酸能力最强, 分别为 1037.88mg/100mL 和 1010.80 mg/100mL, 较之亲株 GS₅ 分别增加了 15% 和 12%, 说明诱变效果明显。接下来, 将对 GSUT₄ 和 GSUT₃ 的遗传稳定性展开研究。

表 4 突变株发酵液的己酸含量

菌株编号	己酸产量 /mg/100mL	产量增加率 /%
GS ₅	902.50 ± 17.42	-
GSUT ₁	934.09 ± 16.92	3.5
GSUT ₂	961.16 ± 19.01	6.5
GSUT ₃	1010.80 ± 18.22	12
GSUT ₄	1037.88 ± 15.70	15
GSUT ₅	934.09 ± 16.89	3.5

(2) 遗传稳定性的研究

变异株经过多次传代后,容易发生回复突变,导致性能降低。为此,本研究分别将 GSUT₄ 和 GSUT₃ 经过斜面培养传代 8 次,并取第 6 代和第 8 代的菌株做己酸发酵实验,检测发酵液己酸含量。研究发现(表 5):较之突变 1 代,GSUT₃ 第 6 代和第 8 代的己酸产量都仅有 0.283% 的轻微变化,说明 GSUT₃ 的遗传性能稳定;而 GSUT₄ 第 6 代和第 8 代的己酸产量分别比第 1 代降低了 12.93% 和 12.78%,说明 GSUT₄ 经过多次传代后,发生了回复突变。

表 5 突变株己酸产量随传代的变化

菌株	己酸产量 /mg/100mL	产量变化率 /%
GSUT ₃ 第 1 代	1010.80 ± 18.22	-
GSUT ₃ 第 6 代	1013.66 ± 17.07	0.283
GSUT ₃ 第 8 代	1013.66 ± 13.42	0.283
GSUT ₄ 第 1 代	1037.88 ± 15.70	-
GSUT ₄ 第 6 代	903.68 ± 10.38	- 12.93
GSUT ₄ 第 8 代	905.24 ± 20.77	- 12.78

(3) 生长变化规律

菌株于乙酸钠改良培养液中,33℃培养 12d 每天取样一次镜检,据检测结果绘制己酸菌的生长曲线(图 1)。研究发现己酸菌突变前后的生长变化趋势一致,在 2-3 天间进入对数生长期,到 4-5 天期间进入生长稳定期。因此,菌种诱变前或是活化菌种时,要以培养 3-4 天的菌种为宜。突变株 GSUT₃ 第 1 代和第 8 代的生长变化趋势一致,再次说明突变株的遗传性稳定。

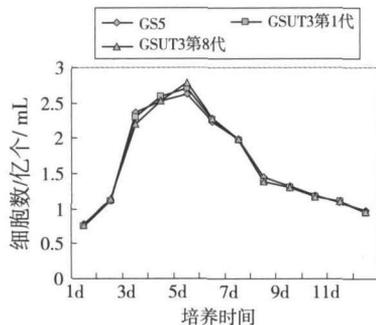


图 1 己酸菌生长变化趋势

(4) 己酸菌的产酸规律

菌株于乙酸钠改良培养液中,33℃培养 12d 每天取

样检测发酵液己酸含量,据检测结果绘制己酸含量变化的规律曲线(图 2)。研究发现己酸菌突变前后,其产酸规律基本一致,第 1-7 天时,己酸含量增长较快,然后进入缓慢增长阶段,到第 10 天时,己酸含量最高,之后略有下降。突变株 GSUT₃ 第 1 代和第 8 代的产酸规律也基本一致,进一步说明突变株的遗传性稳定。

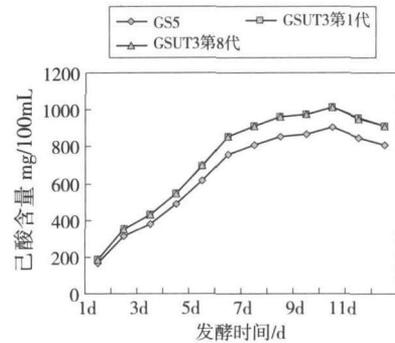


图 2 己酸菌发酵液己酸含量变化趋势

3 讨论

本研究从老窖泥中分离培养出一株产酸能力较高的己酸菌 GS₅ (己酸产量: 902.50 mg/100mL), 以其为亲株, 通过紫外诱变 (照射功率 15W, 照射距离 30cm, 时间为 3min), 筛选到 2 株产酸量比亲株分别提高了 12% 和 15% 的突变株 GSUT₃ 和 GSUT₄。多次继代培养后发现 GSUT₄ 的第 6 代和第 8 代的己酸产量分别比其第 1 代降低了 12.93% 和 12.78%, 说明 GSUT₄ 发生了回复突变; 而 GSUT₃ 的己酸产量稳定。进一步的研究发现 GSUT₃ 与亲株之间, GSUT₃ 第 1 代与第 8 代之间, 其生长变化规律和己酸产量的变化规律都一致, 说明 GSUT₃ 具有较好的己酸增产潜力, 遗传稳定性好, 是较为理想的突变株。

本研究说明紫外线在己酸菌的诱变育种中具有明显的效果。很多研究者还将紫外诱变结合其他诱变方式配合使用, 如赵铭钦等^[4]用紫外线和化学试剂硫酸二乙酯复合诱变后, 筛选得到了巨大芽孢杆菌突变株 B₈。邓毛程等^[5]以枯草芽孢杆菌为出发菌株, 采用紫外、亚硝基胍以及⁶⁰Coγ射线对其进行复合诱变, 获得一株 γ-聚谷氨酸高产突变株, 产量是出发菌株的 3.11 倍, 并且发酵能力稳定。这些诱变方式也是很值得尝试用于己酸菌的选育上的。

参考文献:

- [1] 李大和. 浓香型大曲酒生产技术 [M]. 北京: 中国轻工业出版社, 1997.
- [2] 唐瑞. 己酸菌、窖泥与浓香型白酒之间的关系 [J]. 酿酒, 2005, 32(4): 24-27.

- [3] 李亚蕾, 杨波, 李文霞, 等. 抗噬菌体保加利亚乳杆菌突变菌株 *L. actobacillus burglarius-23UN* 的选育 [J]. 食品研究与开发, 2008, 29(8): 16-20
- [4] 赵铭钦, 李晓强, 王豹祥, 等. α -淀粉酶和蛋白酶高产

- 菌株的诱变选育 [J]. 烟草科技, 2008 (8): 53-57
- [5] 邓毛程, 宋炜, 张远平. γ -聚谷氨酸高产菌株的选育和发酵培养基的初步优化 [J]. 四川理工学院学报: 自然科学版, 2006, 19(3): 47-51.

Research on Caproic Acid Bacteria Isolation from Fermentation Pit Mud and Its Induced Mutation Breeding

XIONG Li, HU Yang, LIU Jun, YUAN Jie, GAO Jiao

(School of Biotechnology Engineering Sichuan University of Science & Engineering Zigong 643000, China)

Abstract Caproic acid is one of the major aromatic component precursor of Luzhou-flavor liquor. A high caproic acid-producing strain GS₅ was screened from the old cellar mud by means of isolation and purification. Then GS₅ was used as the initial strain by means of mutation under the ultraviolet radiation treatment with the power of ultraviolet lamp being 15 W, exposure distance being 30 cm and exposure time being 3 min. A mutant strain GSUT₃ was screened with the yield being 12% higher than that of the original one. The higher caproic acid-producing ability of the mutant was inherited after several subcultures. And the growth principles of strains and the change rules of acid-producing were detected to be coincident between the mutant strain GSUT₃ and the original one, as well as between the first generation and the eighth one of GSUT₃.

Key words caproic acid bacteria, fermentation pit mud, isolation and purification, ultraviolet radiation mutation, growth characterization

(上接第 323 页)

参考文献:

- [1] 王瑞明. 白酒勾兑技术 [M]. 北京: 化学工业出版社, 2006
- [2] 刘光桦, 卢世珩, 黄德英, 等. 红曲霉胞外脂酶催化己酸乙酯合成研究 [J]. 生物工程学报, 1995, 11(3): 288-290
- [3] 王耀, 范文来, 徐岩, 等. 浓香型大曲中酯化酶测定方

- 法的研究 [J]. 酿酒, 2003, 30(2): 18-20
- [4] 郭勇. 酶工程原理与技术 [M]. 北京: 高等教育出版社, 2005
- [5] 姚栗, 程池, 李金霞, 等. Biolog 微生物自动分析系统——细菌鉴定操作规程的研究 [J]. 食品与发酵工业, 2006, 32(5): 50-54

Isolation and Characterization of Bacteria Producing Esterifying Enzyme

HUANG Dan, FANG Chun-yu, CHU Yu-long, SHANG Zhi-dao, YANG Wei

(School of Biotechnology Engineering Sichuan University of Science & Engineering Zigong 643000, China)

Abstract The characterization of bacterial producing esterifying enzyme of different culture conditions were studied. A bacterial strain producing esterifying enzyme was isolated from Luzhou-flavor Daqu and it was identified by Biolog Microbes automated identification System. Culture conditions such as fermentation time, initial pH of fermentation and culture temperature were changed. The fermentation broth were extracted by ethanol and analyzed by GC-MS. The results show that the strain is *Geobacillus thermophilus*. When incubation time was prolonged, methanol and various higher alcohols were gradually decreased and even disappeared, but the ester were gradually increased. When the initial pH of fermentation was increased, the acid were decreased. When pH was 7.5, more ester were produced, but the metabolites were not changed with the initial pH of fermentation such as acetic acid, 3-Hydroxy-2-butanone, acetaldehyde and 3-Methylbutyl alcohol etc. When the culture temperature increased, the kinds of the acid and alcohol slightly increased. When the culture temperature was 35°C, more ester were produced.

Key words Luzhou-flavor Daqu, esterifying enzyme, bacterial identification, metabolite