

浓香型白酒窖泥厌氧细菌的分离鉴定

王 赞, 李光辉, 罗惠波

(四川理工学院酿酒生物技术及应用四川省重点实验室, 四川 自贡 643000)

摘 要:浓香型白酒的生产依赖于窖池,窖池的好坏取决于窖泥微生物,其中厌氧微生物尤为重要。为了认识窖泥厌氧微生物,从浓香型白酒窖泥中分离纯化得到 3 株厌氧细菌,对其进行菌落观察、镜检和生理生化检测,参照《伯杰细菌鉴定手册》进行初步鉴定并确定其属名。3 株厌氧细菌分别为:*Lactobacillus*(乳杆菌属)、*Tsukamurella*(束村氏菌属)、*Sporolactobacillus*(芽孢乳杆菌属)。

关键词:浓香型白酒;窖泥;厌氧细菌

中图分类号:Q93

文献标志码:A

好酒产于好窖,好窖依赖于好泥^[1]。在生产浓香型白酒的窖池中,窖泥的好坏取决于其中微生物种群,优质的窖泥中含有丰富的有利于酿酒的微生物群,这一微生物生态群包括甲烷菌、厌氧异养菌、乳酸菌、己酸菌等多种微生物^[2]。在酒醅入窖发酵过程中,窖泥中的厌氧细菌对酒醅的糖化,乙醇产生等起到了一定作用,其代谢产生的窖香香气是构成浓香型白酒窖香浓郁的重要组成部分^[3]。许多高产己酸乙酯的细菌隶属于厌氧菌,如巨大芽孢杆菌(*Bacillus megaterium*)、梭状芽孢杆菌(*Bacillus fusiformis*)及地衣芽孢杆菌(*Bacillus licheniformis*)等^[4]。所以,窖泥中的厌氧细菌不仅对酒醅发酵起着重要作用,而且对浓香型白酒香味产生有重大作用。

本试验利用传统的稀释平板分离方法,结合厌氧培养的方式,从浓香型白酒的窖泥分离得到 3 株厌氧细菌。经形态学、生理生化特征,参照《伯杰细菌鉴定手册》进行初步鉴定确定其属名。实现了对浓香型白酒窖泥中分离的厌氧细菌的初步鉴定,丰富了浓香型白酒窖泥微生物菌种库,同时也为对浓香型白酒酒醅发酵过程中香味物质的产生的研究提供了理论依据。

1 材料与方 法

1.1 试验材料

窖泥样品:采自泸州鑫霸实业股份有限公司浓香型白酒发酵窖池 2 组 2 号窖池(窖龄 30 年),于窖底中心取样,迅速放入厌氧气袋中置于冰盒运回,4℃保藏,尽快分析。

1.2 主要试剂

结晶紫、番红、过氧化氢、孔雀绿、可溶性淀粉、NaOH(分析纯)、KNO₃(分析纯)、K₂HPO₄(分析纯),刃天青等购自成都科龙试剂公司。

培养基:TSA 培养基购自青岛海博生物试剂公司;YP 培养基:5 g 蛋白胨,1.5 g 酵母膏,0.01 g FeSO₄·7H₂O,20 g 琼脂,溶解于 1 L 水中,PH=7.2;牛肉膏蛋白胨培养基;改良的 CSEA 培养基,将土壤冷水浸出液改为窖池底发酵水稀释液;胰酪酵母琼脂培养基(EG)。

1.3 主要仪器与设备

生物显微成像系统(55i + Ds - SM - U1,日本 NIKON 公司),影像分析菌落计数仪(SCAN 1200 法国),恒温培养箱(MJ - 250,上海和羽良公司),厌氧工作站(DG - 250,英国 DWS 公司),FATO 高压灭菌锅(华通机

收稿日期:2013-09-02

基金项目:四川省科技厅应用基础项目(07JY029-026);酿酒生物技术及应用四川省重点实验室开放基金项目(NJ2012-06;NJ2013-08)

作者简介:王 赞(1977-),男,四川自贡人,讲师,硕士生,主要从事发酵工程方面的研究,(E-mail)379304035@qq.com

电集团有限公司)。

1.4 细菌的分离纯化

1.4.1 培养基的选择

取少量样品直接放入少量生理盐水中,涂片染色直接镜检,指导培养基的选择。选择的结果用胰酪酵母琼脂培养基(EG)进行纯化和保藏,筛选时可用 TSA 培养基、YP 培养基、牛肉膏蛋白胨培养基和胰酪酵母琼脂培养基(EG)。

1.4.2 菌体富集

按改良的 CSEA 培养基配方,配制 450 mL 液体培养基,分装入 3 个三角瓶中,121 °C 灭菌 15 min,待用;在厌氧工作站中,无菌条件取 10 g 窖泥,加入 90 mL 无菌水,充分摇匀,振荡 5 ~ 10 min,使泥样充分打散,自然沉淀后取上清液;将准备好的液体培养基煮沸 10 min,放入厌氧工作站,冷却后,立即接种 10 mL 窖泥上清液,摇匀。37 °C 厌氧培养 3 ~ 4 d。

1.4.3 菌种分离

在厌氧工作站中,取富集液 1 mL,涂布于平板上,TSA 培养基、YP 培养基、牛肉膏蛋白胨培养基和胰酪酵母琼脂培养基(EG)四种培养基接三个平板,37 °C 培养 3 ~ 4 d,挑单菌落,平板划线 37 °C 培养 2 ~ 3 d。对每个平板的菌进行菌落形态观察和镜检,对各种菌归类,接种于胰酪酵母琼脂培养基(EG),平板划线 37 °C 培养 2 ~ 3 d。

厌氧培养中选出的菌种进行好氧和微好氧筛选:将选出的菌种接种到牛肉膏蛋白胨培养基和胰酪酵母琼脂培养基(EG)平板上,分别放到普通培养箱和带有 5% 氧气的氮气袋中培养,37 °C 培养 3 ~ 7 d,观察是否生长。

1.4.4 菌种的纯化

将 1.4.3 选出的菌种,挑取单菌落,转接于胰酪酵母琼脂培养基(EG)平板,37 °C 培养 3 ~ 4 d,依照此法转接 2 ~ 3 次,进行纯化,根据菌落特征及革兰氏染色镜检确认后,挑取单菌落移入斜面,培养后备用。

1.5 生理生化鉴定

芽孢染色:采用改良的 Schaeffer—Fulton 氏染色法^[5]。

表 1 细菌的生理生化鉴定

	芽孢	荚膜	接触酶	淀粉水解	甲基红	反硝化	产氨	革兰氏	吡啶	抗酸
YJ-01	+	+	+	+	-	-	+	-	-	+
YJ-02	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-
YJ-03	+	-	-	+	-	-	+	+	-	+

注:“+”表示“有”或阳性,“-”表示“无”或阴性。

对分离菌种进行革兰氏染色、荚膜染色、接触酶、甲基红、淀粉水解、反硝化、产氨、抗酸和吡啶等实验^[6]。

2 结果与分析

2.1 窖泥中细菌的分离纯化

通过对泸州鑫霸酒厂窖泥菌悬液富集,厌氧培养,从窖泥样品中得到 11 株形态不同的菌株,经过好氧和微好氧筛选,发现有 4 株菌能进行好氧生长,4 株能在 5% 的微量氧气生长,从而排除这 8 株菌株,从窖泥样品中得到 3 株厌氧细菌。

分离纯化得到的 3 株厌氧细菌,分别编号为 YJ-01、YJ-02、YJ-03,对其个体形态、菌落形态观察(图 1)和革兰氏染色镜检(图 2)。YJ-01 在培养基上呈白色、湿润,易于挑取,无黏性,单体呈杆状,革兰氏染色呈阳性。YJ-02 菌落呈浅黄色、湿润,易于挑取,无黏性,单体为球状,多个单菌粘连,革兰氏染色呈阳性。YJ-03 在培养基上呈白色略透明、较湿润,易于挑取,无黏性,单体呈杆状,革兰氏染色呈阳性。



图 1 菌落形态特征图



图 2 细菌镜检图(10 × 100)

2.2 菌种生理生化检测及菌种鉴定结果

试验对 3 株分离纯化好的厌氧细菌进行生理生化检测,并检测芽孢、荚膜等检测,结果见表 1。根据生理生化实验结果,结合《伯杰细菌鉴定手册》^[7]对菌种进行了初步的种类鉴定,鉴定结果分别为:YJ-01 为 *Lactobacillus* (乳杆菌属)、YJ-02 为 *Tsukamurella* (束村氏菌属)、YJ-03 为 *Sporolactobacillus* (芽孢乳杆菌属)。

3 结束语

利用传统的分离纯化方法,结合厌氧培养方式可以

从窖泥中分离出厌氧细菌。经对其菌落形态、单体形态进行观察和生理生化性质检测,参照《伯杰细菌鉴定手册》,获得分离得到的单菌株的属名或种名。这一过程

虽然传统简单,但工作量大。由于实验在分离与纯化这两个过程中利用了很多厌氧的特殊处理方法。运用样品直接涂布,镜检观察,可以在镜检中看到样品中许多菌体形态及染色效果,指导培养基的选择,本实验选出的培养基为牛肉膏蛋白胨培养基和胰酪酵母琼脂培养基(EG);由于厌氧菌不易培养和生长缓慢,先用添加环境营养液的培养基进行富集;对富集的菌悬液进行分离筛选;在筛选过程中培养基一定要新鲜,每次筛选做好有氧检测(指示剂为刃天青);厌氧培养中选出的菌种进行好氧和微好氧筛选,将选出的菌种接种到牛肉膏蛋白胨培养基和胰酪酵母琼脂培养基(EG)平板上,分别放到普通培养箱和带有5%氧气的氮气袋中培养;同时对各株菌的生理生化检测需要做大量的重复试验,确保获得该菌株准确的性质。

本次试验应用传统的细菌鉴定方法,鉴定了获得的3株厌氧细菌,确定了其属名,分别为 *Lactobacillus* (乳杆菌属)、*Tsukamurella* (束村氏菌属)和 *Sporolactobacillus* (芽孢乳杆菌属)。表明传统的细菌鉴定方法对厌氧细菌进行鉴定是切实可行的。这为大批量的菌种分离纯化鉴定给出了一个经济、可行、实用的方法。如果为了更加深入的获得菌种的信息,可以进行 Biolog 自动微生

物鉴定^[7]和分子生物学鉴定^[4]等方法。

参考文献:

- [1] 胡承,应鸿,许德富,等.窖泥微生物群落的研究及其应用[J].酿酒科技,2005(3):34-38.
- [2] 陶勇,徐占成,李东讯,等.窖泥细菌群落结构演替及其与环境因子的相关性[J].酿酒科技,2011(9):42-46.
- [3] 黄治国,卫春会,边名鸿,等.浓香型白酒窖泥中两株细菌的分离鉴定[J].酿酒科技,2012(11):36-38.
- [4] 赵辉,敬颜,王葳,等.浓香型白酒窖泥中高产乙酸兼性厌氧细菌的分离鉴定[J].食品科学,2012(5):177-182.
- [5] 宋瑛琳,王芳,田明.细菌芽孢染色方法比较的研究[J].实验室科学,2012(2):122-123.
- [6] 黄秀梨.微生物学实验指导[M].北京:高等教育出版社,2006.
- [7] 布坎南 R E,吉本斯 N E.伯杰细菌鉴定手册[M].8版.北京:科学出版社,1984.

Separation and Identification of Anaerobic Bacteria From Pit Mud of Luzhou-flavor Liquor

WANG Zan, LI Guanghui, LUO Huibo

(Liquor Making Biological Technology & Application of Key Laboratory of Sichuan Province, Sichuan University of Science & Engineering, Zigong 643000, China)

Abstract: The production of *Luzhou-flavor* liquor depends on pits, and the quality of pits depends on pit mud microbes in which anaerobic bacteria is especially important. In order to realize the pit mud anaerobic bacteria, three strains of anaerobic bacteria are separated from pit mud of *Luzhou-flavor* liquor. After observing colony characteristics, microscopic performance and physiological-biochemical characteristics, referring to Bergey's manual of determinative Bacteriology, the three genus are preliminary identified and determined. The results show that the three strains of anaerobic bacteria are *Lactobacillus*, *Tsukamurella*, *Sporolactobacillus* separately.

Key words: *Luzhou-flavor* liquor; pit mud; anaerobic bacteria