

浓香型酒窖中生丝微菌的分离与特性*

王岩 吴衍庸

(中国科学院成都生物研究所,成都)

摘要 从浓香型大曲酒发酵糟中,首次分离到一株能利用甲醇为唯一碳源和能源的生丝微菌 *Hyphomicrobium* sp. M7。该菌具有独特的形态学特征:细胞顶端常生长一根菌丝结构。通过菌丝出芽而繁殖。细胞呈卵圆形,单独存在。菌落淡褐色。该菌对甲醇有较大的亲和力。在甲醇存在时,能以 NO_3^- 为电子受体进行厌氧生长。能利用甲醇、甲胺类化合物、乙醇、乙酸盐作为碳源生长,不利用 C_2 以上的有机物。在乙醇为碳源的培养基上,菌丝顶端常长出一种喇叭口结构。最适氮源为 NH_4^+ , 酒糟浸液、酵母膏对生长有促进作用。该菌不同于文献报道的已知种。讨论了该菌在酒窖中存在的生态意义。

关键词 生丝微菌; 甲醇利用菌

酒窖是一个特殊的微生物生态环境,作者首次从浓香型曲酒窖的发酵糟中分离到一株生丝微菌 M7。本文对 M7 菌株的分离特性以及与浓香型曲酒发酵的关系作一报道。

材料和方法

(一) 菌株来源

菌株 M7 分离自四川省浓香型酒窖发酵鲜酒糟。

(二) 分离方法

1. 培养基 (g): KH_2PO_4 1.3, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 3.7, NH_4Cl 0.5, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.1, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.2, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 5.0×10^{-3} , $\text{CaSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 3.9×10^{-3} , $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0.3×10^{-3} , $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.4×10^{-3} , $\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.25×10^{-3} , $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.04×10^{-3} , EDTA 0.01, CH_3OH 5ml (99.5% 含量), 蒸馏水 100 ml, pH7.0。

磷酸盐单独灭菌,冷却至 60°C 加入。固体培养基加琼脂 20 g/l。

2. 分离与纯化: 取 250 ml 三角瓶盛 50 ml 液体培养基接种 5g 左右的样品,用 1 N NaOH 液调至 pH 7.0,放入 35°C 恒温旋转式摇床振荡培养,7 天后培养物呈乳白色。浊度增加,取富集液作系列稀释涂平板,5 天后平板上挑单

个典型菌落,反复划线分离、纯化。

(三) 鉴定方法

主要参照《伯杰氏细菌鉴定手册》第八版进行^[1]。

(四) 生理实验条件

各种有机物氮源和碳源均分别配成 pH 7.0, 经高压灭菌或过滤灭菌,按 0.1% 加入除去碳源或氮源的液体培养基。复合维生素参照日本 Mimura 的复合维生素浓度比配制^[2]。厌氧培养用厌氧管,装 15 ml 0.1% NH_4Cl 或 0.1% KNO_3 为氮源的培养基,接种斜面制得菌悬液,通入过滤 CO_2 排除管内和培养基内空气,再密封 35°C 培养,5 天后观察生长情况。

结果

(一) M7 菌形态和培养特征

1. 菌体形态: 细胞呈卵圆形,无芽孢,大小 $0.5-0.8 \times 1.0-1.5 \mu\text{m}$, 细胞一端具有一极生丝状体结构,丝顶端常出现一个突起(图 1a)。繁殖通过丝状体产生一个芽的方式形成子细胞,芽体能运动,具亚极生鞭毛(图 1b)。不同培养条件,细胞个体形态差异较大,一般生长条件

* 彭世琼协助参加实验室工作

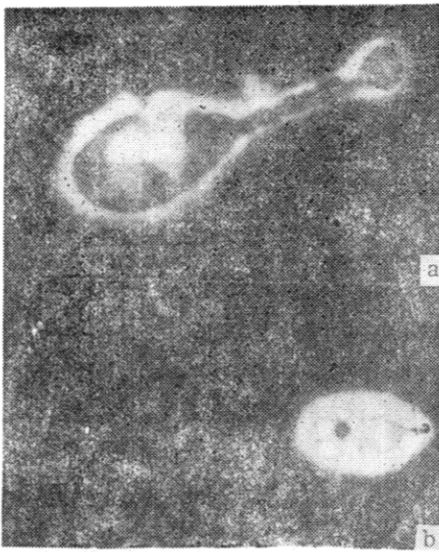


图1 M7菌株的形态特征

a. 在甲醇培养基上产生较短的菌丝 b. 芽体的鞭毛结构

适合, 细胞产生菌丝较短, 生长条件不适合时菌丝变长。在乙醇为碳源的培养基上形成较长菌丝; 并具典型玫瑰花结排列。有时菌丝顶端常出现一种喇叭型特殊结构。老龄菌用苏丹黑染色, 发现有聚β-羟丁酸的积累。

(二) 温度对 M7 的影响

将以甲醇为碳源的一系列培养基接种: 并

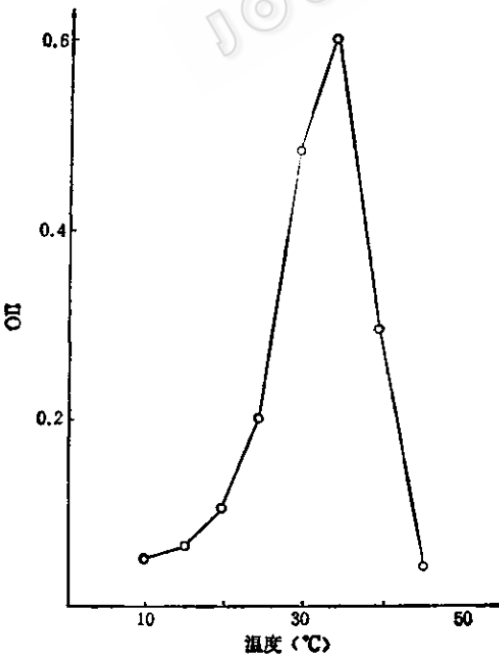


图2 温度对 M7 生长的影响

放置不同温度的恒温箱静置培养 3 天, 结果见图 2。生长范围为: 20—40°C, 温度最适为 34°C。

(三) pH 对 M7 的影响

用 1N 的 NaOH 和 HCl 调成一系列不同 pH 的培养基(成份同前), 接种瓶于 34°C 恒温振荡培养, 结果见图 3, pH 范围为 5—9, 最适 pH 为 7。

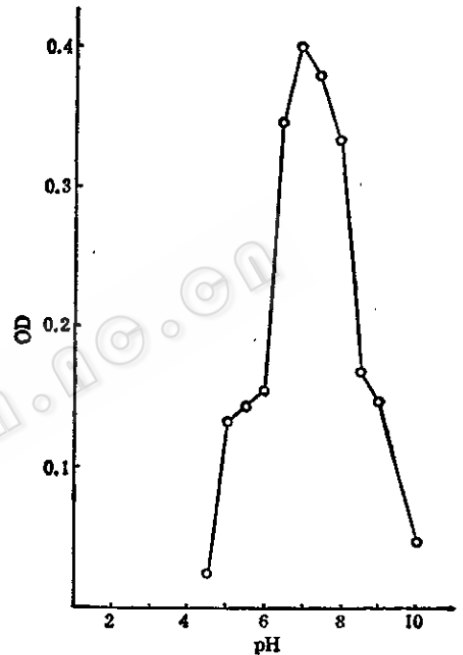


图3 pH 对 M7 生长的影响

(四) 基质的利用

1. 碳源: M7 能利用甲醇、乙醇、乙酸盐、甲胺、二甲胺、三甲胺作为碳源生长。不利用甲醛、丙醇、丙二醇、丙酸盐、丁酸盐、异丁酸盐、乳酸盐、草酸盐、琥珀酸盐、己酸盐、甲烷、葡萄糖、果糖、甘露醇、麦芽糖、乳糖、阿拉伯糖、木糖、山梨糖、纤维二糖、丙酮等。牛肉膏、酵母膏、蛋白胨、水解酪朊上出现有极微量生长, 但不能传代。不加任何碳源的培养基上不生长。

2. 氮源: 在好氧条件下 M7 能利用铵盐、硝酸盐、谷氨酰胺, 最适氮源为 NH₄Cl, 不利用尿素。

(五) 有机物对 M7 生长的影响

酵母膏、复合维生素^[2]、酒糟浸液、黄水(滴

窖母糟液)对M7的生长有明显的促进作用。

(六) 底物初液浓度对M7生长的影响

将一系列不加碳源的培养基加入不同浓度的甲醇、乙醇、接种瓶于34℃振荡培养3天。结果见表1、表2。

表1 甲醇浓度对M7生长的影响

甲醇浓度(%)	0.1	0.5	1.0	1.5	2.0
OD	0.15	0.57	0.54	0.49	0.35

从表1可看出:当甲醇浓度为0.5%时,菌浓OD值最大,不同浓度比较则以0.1%时,OD值最小。

表2 乙醇浓度对M7生长的影响

乙醇浓度(%)	0.1	0.5	1.0	2.5	5.0
OD	0.30	0.54	0.32	0.05	0.02

从表2可看出:乙醇浓度在0.5%时,OD值为最大,当浓度达到2.5%时,OD值明显降低。

(七) 厌氧生长实验

Hyphomicrobium 以 NO_3^- 为电子受体进行厌氧生长,这是该菌区别于其它甲醇菌的重要特征之一。实验结果见表3。M7在以甲醇为碳源、 NO_3^- 为氮源时,能进行厌氧生长。如用 NH_4^+ 代替 NO_3^- 不发生厌氧生长。厌氧生长的最适 NO_3^- 浓度为0.5%。利用厌氧方法富集 *Hyphomicrobium*, 实验证明也是一种较为灵敏的方法。

表3 M7 厌氧生长与好氧生长比较

培养条件	培养天数	碳源	氮源	OD
好氧	2	甲醇	NO_3^-	0.10
	2		NH_4^+	0.58
厌氧	5	甲醇	NO_3^-	0.38
	5		NH_4^+	0.01

讨 论

1. 关于M7的分类地位问题:根据《伯捷氏细菌学鉴定手册》第八版对*Hyphomicrobium* 只提到一个种 *H. Vuglare*^[3]。1982日本Izumi

等分离出一株专性嗜甲基的 *H. sp. km 146*^[3]。另外 Kanamaruete 也报道过一株菌 *H. sp. Jis-8111*, 特征与 KM146 相似^[4]。由此 Izumi 等提出建立新种,命名为 *Hyphomicrobium methylororum*。作者1986年从四川浓香型酒窖酒糟中分离得到的M7菌株。具有 *Hyphomicrobium* 属的特征;但与同属已知种比较,又有较大的差异,主要表现在对碳源的利用上。*H. Vuglare* 能利用 C_2 以上化合物。*H. methylororum* 只利用 C_1 化合物,而M7则只利用 C_1 和 C_2 化合物,与 *H. Vuglare* 的差异还表现在尿素利用上。M7不能利用尿素为碳源,*H. Vuglare* 能利用尿素。在与 *H. methylororum* 的差异又表现在反硝化作用上,M7具有反硝化作用,*H. methylororum* 不表现反硝化作用。此外,M7与 *H. methylororum* 的区别还表现在菌落同心圆结构、菌落颜色、群体细胞构成的玫瑰花结排列上也有所不同,由此M7菌株是否也应立为新种,有待确认。

2. 生丝微菌在窖内发酵糟中存在的工业生态意义:甲醇是对人体健康有害的物质,在浓香型曲酒中规定每100毫升酒中不超过0.04克,然而对浓香型曲酒的传统酿制上,一般不存在有甲醇超标这一问题,这是与浓香型曲酒的传统工艺有关,也是奥秘所在^[5]。我们的研究发现:浓香型曲酒发酵母糟中存在一类甲醇利用菌 *Hyphomicrobium*, 一般已知的甲醇利用菌多为好氧菌,唯有 *Hyphomicrobium* 能进行厌氧生长,酒窖是厌氧发酵环境,我们在利用甲醇富集培养酒糟中的甲醇利用菌时, *Hyphomicrobium* 的生长占优势,它是构成浓香型酒糟微生物区系组成中的一员。不难理解,它的功能和作用的发挥,对酿制浓香型曲酒具有特殊的意义。

参 考 文 献

1. Buchanan R E et al.: *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, 8th ed., The Williams & Wilkins Co., Baltimore/London, 1974.
2. Mimura A and M: Wada *J. Ferment. Technol.*, **56** (4): 243 1978.
3. Izumi Y et al.: *J. Ferment. Technol.*, **60**: 371 1982.

4. Kanamaru K et al.: *Agric. Biol. Chem.*, 46(10): 24, 1982.
5. 吴衍庸编著: 浓香型曲酒微生物技术, 四川科技出版社, 成都, 1986。