

# 浓香型白酒大曲中酵母菌的分离和鉴定

张磊<sup>1</sup> 施思<sup>1</sup> 张文学<sup>1</sup> 李波<sup>2</sup> 唐云容<sup>2</sup> 杨开梅<sup>2</sup>

(1.四川大学轻纺与食品学院,四川 成都 610065;2.贵州茅台酒厂(集团)习酒有限责任公司,贵州 习水 564622)

**摘要:** 从习酒大曲中分离到优势酵母菌 24 株,选择了其中具有代表性的 5 株纯培养菌株。经菌落特征、细胞形态、生理生化特性等常规分类方法,结合 18S rDNA 序列分析,对这 5 株酵母菌做了系统鉴定。结果表明, Q<sub>0</sub>-45 和 *Saccharomyces sp.*、Q<sub>0</sub>-47 和 *Debaryomyces hansenii*、Q<sub>1</sub>XP-6 和 *Candida pseudolambica*、Q<sub>1</sub>XP-8 和 *Issatchenkia orientali*、Q<sub>1</sub>XX-46 和 *Saccharomyces cerevisiae* 分别具有较高的相似性。经典分类学和分子生物学方法的结合,对传统白酒微生物菌群的快速、准确认识和目的性纯菌株的利用具有重要意义。

**关键词:** 大曲; 酵母; 分离; 鉴定; 18S rDNA

中图分类号: TS261.1; TS261.4; TS262.3

文献标识码: A

文章编号: 1001-9286(2010)05-0039-03

## Isolation and Identification of Yeast Strains from Luzhou-flavor Daqu

ZHANG Lei<sup>1</sup>, SHI Si<sup>1</sup>, ZHANG Wen-xue<sup>1</sup>, LI Bo<sup>2</sup>, TANG Yun-rong<sup>2</sup> and YANG Kai-mei<sup>2</sup>

(1. Textile Industry & Food Science College of Sichuan University, Chengdu, Sichuan 610065;

2. Xijiu Co.Ltd., Guizhou of Maotai Group, Xishui, Guizhou, 564622, China)

**Abstract:** 24 dominant yeast strains had been isolated from Xijiu Daqu starter and 5 representative pure culture strains were selected. These 5 strains were identified through general classification methods (including colony characteristics, cell morphology, physiological and biochemical properties etc.) supplemented with 18S rDNA sequence analysis. The results showed that Q<sub>0</sub>-45 and *Saccharomyces sp.*, Q<sub>0</sub>-47 and *Debaryomyces hansenii*, Q<sub>1</sub>XP-6 and *Candida pseudolambica*, Q<sub>1</sub>XP-8 and *Issatchenkia orientali*, and Q<sub>1</sub>XX-46 and *Saccharomyces cerevisiae* showed high similarities respectively. The combination of classical taxonomy and molecular biological methods was of great significance in rapid and accurate identification of microbial community in traditional liquor and the use of pure strains.

**Key words:** Daqu; yeast strains; isolation; identification; 18S rDNA

大曲是酿制传统大曲酒的糖化剂、发酵剂和增香剂,同时也是传统白酒酿造的中间原料和生产动力,含有多种微生物及产生的多种酶类,在酿造过程中起着重要的糖化、发酵和生香的作用,直接或间接影响白酒的产量、质量和风格<sup>[1-3]</sup>。浓香型习酒大曲的制作工艺为自然发酵,网罗和富集了原材料和环境中的微生物,微生物区系十分复杂。经初步分类鉴定,浓香型习酒大曲中包含不少于 2 个属的细菌、不少于 5 个属的丝状真菌、不少于 5 个属的酵母菌<sup>[4]</sup>。酵母菌是大曲主要功能微生物菌群之一,主要有产酒的酒精酵母类群和产香的产酯酵母类群<sup>[5]</sup>。不同类群酵母菌的数量及构成,对大曲酒产率及风格特征具有极大影响。因此,研究大曲中酵母菌的组成对提高大曲质量有重要意义。

## 1 材料与方法

### 1.1 样品

贵州茅台酒厂(集团)习酒有限责任公司,夏季大曲。

收稿日期:2010-04-02

作者简介:张磊(1984-),硕士研究生,研究方向:酿造与发酵食品。

通讯作者:张文学(1963-),教授,博导,研究方向:发酵工程,E-mail:foodbiotech@126.com。

### 1.2 试剂和设备

0.067%孟加拉红,青霉素钠(添加量为 1600 U/mL); UNI-Q-10 柱式细菌基因组 DNA 抽提试剂盒,购自上海生工生物工程技术有限公司;2×Taq PCR Master-Mix,购自北京天根生化科技有限公司;PCR 扩增引物,购自上海生工生物工程技术有限公司;无菌工作台,电热恒温培养箱,显微镜,压力灭菌锅等。

### 1.3 培养基

#### 1.3.1 YEPD 培养基

葡萄糖 20 g,蛋白胨 20 g,酵母膏 10 g,琼脂 20 g,水 1000 mL,115℃灭菌 30 min。

#### 1.3.2 葡萄糖发酵培养基

黄豆芽 125 g,酵母膏 6 g,葡萄糖 20 g,水 1000 mL,115℃灭菌 30 min。

#### 1.3.3 氮源同化培养基<sup>[6]</sup>

葡萄糖 20 g,KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1 g,MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.5 g,酵母膏

0.2 g,琼脂 20 g,水 1000 mL,过滤后分装试管,115 ℃灭菌 30 min。

## 1.4 实验方法

### 1.4.1 酵母菌的分离

采用平板稀释法分离菌株<sup>[7]</sup>。25 ℃培养 2~3 d,以菌落外观形态为主,配合菌体形态,观察计数,2~3 次纯化后接入斜面,置于冰箱 4 ℃保存。

### 1.4.2 酵母菌的常规鉴定

#### 1.4.2.1 酵母菌的形态学观察<sup>[8-9]</sup>

将菌株分别移接于 YEPD 培养基中,于 25 ℃下培养 3 d 后观察其细胞形态及菌落形态特征。

#### 1.4.2.2 酵母菌的生理学特性比较

##### 1.4.2.2.1 发酵糖类实验

选用糖发酵培养基,接种后 25 ℃培养,每隔 12 h 观察发酵情况。

##### 1.4.2.2.2 氮源同化实验

选用氮源同化培养基,接种后 25 ℃培养 2 d 观察。

### 1.4.3 酵母菌的分子鉴定

#### 1.4.3.1 总基因组 DNA 提取

收集过夜培养的细胞,用裂解液(100 mmol/L Tris-Cl, 5 mmol/L EDTA, 500 mmol/L NaCl, 1 %SDS, pH 7.5)重悬,在-20 ℃反复冻融 3 次后,65 ℃处理样品 30 min,4 ℃,12000 r/min,离心 10 min,收集上清液即释放的 DNA。利用试剂盒中 DNA 特异性吸附柱并根据说明书操作步骤对基因组进行漂洗,洗脱,收集。DNA 置于-20 ℃保存。

#### 1.4.3.2 18S rDNA 片段扩增及测序

用引物 EF4(5'-GGAAGGGRTGTATTTATTAG-3')和 EF3(5'-TCCTAAATGACCAAGTTTG-3')<sup>[10]</sup>。反应体系(50 μL)为:模板 DNA 4 μL,引物 EF4(10 μmol/L)和 EF3(10 μmol/L)各 2 μL,2×PCR MasterMix 25 μL,双蒸水 17 μL。PCR 程序如下:94 ℃预变性 5 min;94 ℃变性 1 min,48 ℃退火 1 min,72 ℃延伸 2 min,共循环 35 次;最后 72 ℃延伸 10 min,4 ℃保存。PCR 产物纯化后测序,测序由上海生工生物工程技术有限公司完成。

#### 1.4.3.3 菌株同源性比对

用 18S rDNA 序列的测序结果在 GenBank 数据库中进行同源性序列搜索,以比较分离菌株与已知酵母菌相应序列的相似性。

## 2 结果与讨论

### 2.1 大曲酵母菌纯菌株分离结果

从习酒大曲(发酵期)中分离到优势酵母菌 24 株,根据其形态和培养特征,选取最有代表性的 5 株纯培养菌株。分别编号为:Q<sub>0</sub>-45,Q<sub>0</sub>-47,Q<sub>1</sub>XP-6,Q<sub>1</sub>XP-8 和 Q<sub>1</sub>XX-46。

### 2.2 常规分类鉴定结果

根据各菌株的细胞形态、菌落形态,以及生理生化培养特性,参照《酵母菌的特征与鉴定手册》的检索路径,对上述 5 菌株进行了基本的分类,初步将 Q<sub>0</sub>-45、Q<sub>0</sub>-47、Q<sub>1</sub>XP-6、Q<sub>1</sub>XP-8 和 Q<sub>1</sub>XX-46 分别归类为酵母属、德氏酵母属、假丝酵母属、伊萨酵母属和酵母属。由于实验数据指标较少,以及存在一些不确定因素,分类结果尚有待于进一步确认。细胞形态见表 1~表 3。

表1 细胞形态

| 编号                   | 形状     | 繁殖方式 | 假菌丝 | 其他特征 |
|----------------------|--------|------|-----|------|
| Q <sub>0</sub> -45   | 腊肠, 椭圆 | 多边芽殖 | 无   | —    |
| Q <sub>0</sub> -47   | 圆      | 多边芽殖 | 无   | —    |
| Q <sub>1</sub> XP-6  | 椭圆     | 多边芽殖 | 有   | 一端略尖 |
| Q <sub>1</sub> XP-8  | 卵圆     | 多边芽殖 | 无   | —    |
| Q <sub>1</sub> XX-46 | 卵圆, 椭圆 | 多边芽殖 | 无   | —    |

表2 菌落形态

| 编号                   | 颜色 | 湿润度 | 光泽 | 形态          |
|----------------------|----|-----|----|-------------|
| Q <sub>0</sub> -45   | 白  | 湿润  | 无  | 表面较平滑       |
| Q <sub>0</sub> -47   | 乳白 | 湿润  | 无  | 表面平滑        |
| Q <sub>1</sub> XP-6  | 乳白 | 较湿润 | 无  | 中间有突起, 边缘丝状 |
| Q <sub>1</sub> XP-8  | 白  | 湿润  | 无  | 表面平滑        |
| Q <sub>1</sub> XX-46 | 乳白 | 湿润  | 无  | 表面较平滑       |

表3 生理特性比较

| 菌种                   | 是否发酵 | 发酵特征    | 是否同化氮源 |
|----------------------|------|---------|--------|
| Q <sub>0</sub> -45   | 一般   | 产膜      | 否      |
| Q <sub>0</sub> -47   | 弱    | —       | 否      |
| Q <sub>1</sub> XP-6  | 一般   | —       | 否      |
| Q <sub>1</sub> XP-8  | 一般   | —       | 否      |
| Q <sub>1</sub> XX-46 | 强    | 产膜, 产气快 | 否      |

### 2.3 分子鉴定结果

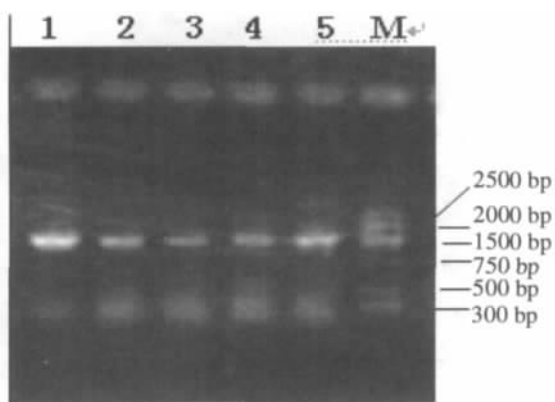
#### 2.3.1 DNA 提取和 PCR 扩增

以 EF4 和 EF3 为引物通过酵母菌特异性 PCR 反应扩增得到 18S rDNA 序列,扩增产生的 DNA 片段为单一条带,大小长度约为 1500 bp,扩增产物无明显非特异扩增现象,结果见图 1。

#### 2.3.2 18S rDNA 序列相似性

测定 5 株大曲酵母菌 18S rDNA 约 1500 bp 的序列,测得序列向日本 DDBJ 数据库提交,将测序结果在 GenBank 核酸序列数据库中进行同源性序列搜索,检索结果见表 4。

从表 4 可知,5 株大曲酵母菌与 GenBank 数据库中已知酵母的 18S rDNA 序列具有较高的相似性(≥99 %),可以判断为同种。同时,所得分子生物学分析结果与常规培养鉴定结果在属层面上一致性较好,既肯定了常规分类鉴定结果(实验尚不完备),也较为快速、准确地获得了分离纯化酵母菌株的更为详尽的系统分析鉴定结果。



M.DL2500 marker, 1. Q<sub>0</sub>-45, 2. Q<sub>0</sub>-47, 3. Q<sub>1</sub>XP-6, 4. Q<sub>1</sub>XP-8, 5. Q<sub>1</sub>XX-46

图 1 5 株酵母菌的 18S rDNA 电泳图

表 4 5 株酵母菌的 18S rDNA 序列相似性分析

| 编号                   | 登录号      | 相似菌株                            | 相似度 (%) |
|----------------------|----------|---------------------------------|---------|
| Q <sub>0</sub> -45   | AB536779 | <i>Saccharomyces</i> sp.        | 99.8    |
| Q <sub>0</sub> -47   | AB536780 | <i>Debaryomyces hansenii</i>    | 100     |
| Q <sub>1</sub> XP-6  | AB536781 | <i>Candida pseudolambica</i>    | 99.6    |
| Q <sub>1</sub> XP-8  | AB536782 | <i>Issatchenkia orientalis</i>  | 99.6    |
| Q <sub>1</sub> XX-46 | AB536786 | <i>Saccharomyces cerevisiae</i> | 100     |

### 3 结论

3.1 分子生物学方法是目前的热点,解决了一大批传统方法难以确定其分类学地位的菌株,特别是纯菌株 DNA 序列分析,具有操作简便、结果客观、重复性好的优点。虽然经典分类学研究实验条件的要求不高,但方法复杂,试验工作量大,而且结果也可能不够精确,因而,将多种方法综合分析所得出的结论更加令人信服<sup>[11-12]</sup>。

3.2 课题组用经典分类学和分子生物学的方法对习酒大曲中主要酵母菌进行分类鉴定,研究发现:Q<sub>0</sub>-45 与

*Saccharomyces* sp. 的相似性为 99.8 %,Q<sub>0</sub>-47 与 *Debaryomyces hansenii* 的相似性为 100 %,Q<sub>1</sub>XP-6 与 *Candida pseudolambica* 的相似性为 99.6 %,Q<sub>1</sub>XP-8 与 *Issatchenkia orientalis* 的相似性为 99.6 %,Q<sub>1</sub>XX-46 与 *Saccharomyces cerevisiae* 的相似性为 100 %。新的微生物分类方法都源于经典传统分类方法的发展,将各类方法结合起来,有利于更好地理解现代分类学方法,并取得突破。

### 参考文献:

- [1] 任飞,周红海,韩珍琼. 夏季浓香型大曲生产的工艺控制[J]. 酿酒科技, 2007, (8): 56-58.
- [2] 姚万春,唐玉明,任道群,等. 泸州老窖国窖曲坯层次间微生物差异研究[J]. 酿酒, 2005, 32(5): 35-36.
- [3] 孙家芳. 关于大曲中有效菌种的培养及应用的探索[J]. 酿酒, 2005, 32 (1): 16-17.
- [4] 齐慧. 黔派浓香型白酒典型环境酿酒微生物资源的调查研究[D]. 成都: 四川大学, 2009.
- [5] 惠丰立,柯涛,褚学英,张彩莹,陶爱丽. 大曲中酵母菌种群结构及多样性分析[J]. 食品与生物技术学报, 2009, 28(1): 102-104.
- [6] 张纪中. 微生物分类学[M]. 上海: 复旦大学出版社, 1989.
- [7] 周德庆. 微生物学实验手册[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1986.
- [8] 牛天贵. 食品微生物学实验技术[M]. 北京: 中国农业大学出版社, 2002.
- [9] 赵斌,何绍江. 微生物学实验[M]. 北京: 科学出版社, 2002.
- [10] 张文学,乔宗伟,胡承,等. 浓香型白酒糟醅中真菌菌群的多样性分析[J]. 四川大学学报(工程科学版), 2006, 38(5): 97-101.
- [11] 褚学英,惠丰立,李晓辉. 大曲中主要酵母菌的分子鉴定[J]. 中国酿造, 2008, (5): 27-29.
- [12] 李岷玥. 典型酿酒微生态中优势酵母菌的分离鉴定[D]. 成都: 四川大学, 2009.

(上接第 38 页)

从表 4 和表 5 可知,除了  $\alpha$ -2 菌株以外,各菌株生长状况及发酵力均相差不大。各菌株黄酒发酵液酒度也均在 11 %vol 以上,其中 a-3、 $\alpha$ -1 及亲本黄酒发酵液的酒度达到了 14 %vol。a-3、a-5 和  $\alpha$ -1 发酵液的残糖含量均低于亲本菌株。a-3 的乙酸乙酯产量最高,且高于亲本菌株;各单倍体的异戊醇产量均低于亲本菌株。综合比较,选定性能最优的单倍体菌株 a-3 和  $\alpha$ -1 为遗传育种单倍体亲本。

### 3 结论

3.1 利用胰蛋白胨培养基于 25 °C 条件下将工业生产上用的黄酒酵母培养 7 d,使其产生子囊孢子,再经过子囊孢子分离成功制备了黄酒酵母的单倍体。

3.2 通过耐酒精、耐高糖、耐乳酸的耐受性比较、模拟黄

酒发酵能力以及黄酒发酵液中残糖、酒精度和风味成分分析,筛选出了 a-3 和  $\alpha$ -1 两株具有优良耐受性能且风味成分产量较好的黄酒酵母单倍体菌株,为后续的遗传育种改良黄酒酵母及优化黄酒风味奠定良好基础。

### 参考文献:

- [1] 张秋汀,魏桃英.改良型黄酒工艺初探[J].酿酒科技,2007,(1): 71-72.
- [2] 白彦彦.酿酒酵母属的分类学研究进展[J].微生物学通报, 2000, 27(2): 139-140.
- [3] 李华,刘丽丽,李娟. 酿酒酵母产孢培养基的筛选及单倍体的分离[J].酿酒科技,2008,(6): 22-27.
- [4] 王英凯,王薇春.啤酒酵母和糖化酵母的产孢及其单倍体的制备[J].食品与发酵工业, 1990, (3): 13-17.
- [5] 肖冬光,刘青,李静,姜天笑.酿酒酵母单倍体制备方法的优化[J].酿酒科技,2004,(4): 21-22.