

# 浓香型大曲中两株酵母菌的分离 及其 Biolog 微生物鉴定

卫春会<sup>1,2</sup>, 杨晓东<sup>1</sup>, 黄治国<sup>1,2</sup>, 叶光斌<sup>1,2</sup>, 罗惠波<sup>1,2</sup>, 王毅<sup>1</sup>

(1.四川理工学院生物工程学院,四川 自贡 643000;2.酿酒生物技术及应用四川省重点实验室,四川 自贡 643000)

**摘要:** 采取传统微生物手段从浓香型大曲中分离纯化得到两株酵母菌,对其进行菌落特征观察和镜检后,利用 Biolog 微生物自动鉴定系统进行鉴定。鉴定结果表明,两株菌分别是约氏掷孢酵母 A(*Sporidiobolus johnsonii* A)和葡萄牙棒孢酵母(*Clavispora lusitaniae*)。

**关键词:** 浓香型大曲; 酵母菌; Biolog 鉴定系统

中图分类号:TS261.1;TS262.31;Q93-3;TS261.4 文献标识码:A 文章编号:1001-9286(2013)04-0030-03

## Isolation and Biolog Identification of Two Yeast Strains from Nong-flavor Daqu

WEI Chunhui<sup>1,2</sup>, YANG Xiaodong<sup>1</sup>, HUANG Zhiguo<sup>1,2</sup>, YE Guangbin<sup>1,2</sup>, LUO Huibo<sup>1,2</sup> and WANG Yi<sup>1</sup>

(1.School of Bioengineering, Sichuan University of Science & Engineering, Zigong, Sichuan 643000; 2. Liquor-making Biotech & Application Key Lab of Sichuan Province, Zigong, Sichuan 643000, China)

**Abstract:** Two yeast strains were isolated and purified from Nong-flavor Daqu through traditional microorganism isolation methods. After the observation of colony characteristics and microscopic examination, the two strains were then identified by use of Biolog system and the identification results showed that the two strains were *Sporidiobolus johnsonii* A and *Clavispora lusitaniae*.

**Key words:** Nong-flavor Daqu; yeast strains; Biolog identification

在浓香型白酒生产过程中,大曲是富集培养有益微生物及其代谢产物的载体,对白酒品质有十分重要的影响<sup>[1]</sup>。大曲微生物主要包括细菌、霉菌、酵母菌和放线菌等<sup>[2]</sup>,其中酵母菌在发酵代谢过程中对白酒的风格形成起到重要作用,是产酒精与产香味的重要来源<sup>[3]</sup>。在整个白酒生产中,酵母菌的种类和存在状况在一定程度上决定了白酒的质量,为保证白酒的产量和质量,对酵母菌进行系统、具体的研究十分必要<sup>[4]</sup>。

本研究从浓香型大曲中酵母菌的筛选着手,采用稀释平板法分离获得两株酵母菌。通过微生物菌落特征观察和镜检,初步确定两株菌为不同的酵母菌,然后利用 Biolog 自动微生物鉴定系统对其种类进行鉴定,实现了 Biolog 鉴定系统在浓香型大曲微生物鉴定中的具体应用,从而丰富白酒功能微生物菌种库菌种资源,同时也为今后对发酵过程中酵母菌特性的研究提供理论基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料、试剂及仪器

浓香型大曲样品: 采自泸州老窖股份有限公司制曲分公司。

试剂及培养基: 蛋白胨、酵母膏、琼脂粉、麦芽汁琼脂培养基等生化试剂购自成都科龙化工; 生理盐水、无菌水、酵母膏胨葡萄糖(YPD)琼脂培养基、马铃薯葡萄糖琼脂(PDA)培养基<sup>[5]</sup>、麦芽汁琼脂培养基均为现用现配; BUY 琼脂培养基、YT MicroPlate 等购自美国 Biolog 公司。

仪器设备: Biolog 自动微生物鉴定系统、浊度仪、电动移液器(MicroStation, 美国 Biolog 公司), 正置生物显微成像系统(55i-Ds-5M-U1, 日本 NIKON 公司), 全自动高压灭菌锅(MLS-3020, 日本三洋公司), 恒温振荡培养箱(BS-2F, 常州精成国华仪器有限公司), 生化培养箱(MJ-250, 上海和羽良公司), 超净工作台(SW-CJ-1F, 苏

基金项目: 四川省科技厅应用基础项目(07JY029-026); 四川省教育厅重大培育项目(09ZZ015); 四川理工学院人才引进项目(2007-18\_2010XJKRL001)。

收稿日期: 2012-10-23

作者简介: 卫春会(1980-), 女, 陕西宝鸡人, 实验师, 硕士, 主要从事发酵工程方面的科研和教学。

优先数字出版时间 2013-01-05; 地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/52.1051.TS.20130105.1620.006.html>。

净集团)。

## 1.2 试验方法

### 1.2.1 酵母菌的分离纯化

称取 10g 粉碎后的大曲样品, 在无菌条件下置于带玻璃珠的 90 mL 无菌生理盐水中, 以 150 r/min 振荡 30 min 后取上清液, 得到  $10^{-1}$  稀释样<sup>[6]</sup>。然后依次制成  $10^{-2}$ ~ $10^{-7}$  稀释样。吸取各梯度稀释液 100  $\mu$ L 分别涂布于 YPD 培养基、PDA 培养基、麦芽汁琼脂培养基上, 以 30  $^{\circ}$ C 培养 48~72 h, 挑取单菌落, 平板多次划线纯化。根据菌落特征及镜检确认为酵母菌后, 移入斜面保藏备用。

### 1.2.2 Biolog 自动微生物鉴定系统鉴定

BUY 琼脂培养基的制备: 称取 BUY 琼脂培养基 5.7 g, 加入到 100 mL 蒸馏水中, 加热溶解, 冷却后调整 pH 值至 5.6 左右。121  $^{\circ}$ C 高压湿热灭菌 15 min, 冷却至 45~50  $^{\circ}$ C 时, 于超净工作台上倒平板备用。

BUY 琼脂培养基培养: 将分离得到的纯种酵母菌进行十字接种于 BUY 琼脂培养基上, 倒置于培养箱以 30  $^{\circ}$ C 恒温培养 48~72 h, 培养 2 代, 如果菌量较少, 不足以接种鉴定板时, 可多接几块平板。

YT 鉴定板培养及 biolog 鉴定<sup>[7]</sup>: 先以装有空白无菌水玻璃管调 100%T 透光率, 标准比浊管校正浊度仪。再在无菌条件下, 用灭菌棉签从 BUY 培养基平板上挑取十字接种外周的菌落, 接种于无菌水中, 制备成 47%T 的菌悬液, 然后接种于 YT 鉴定板上, 操作时间控制在 20 min 以内, 每孔菌悬液接种量 100  $\mu$ L。再将鉴定板放入一个密闭的塑料袋或其他盒中, 加入浸湿的纸团或毛巾, 用以保持湿度, 避免在培养过程中使鉴定板中菌悬液因蒸发减少而影响测定结果。

将鉴定板放入培养箱, 26  $^{\circ}$ C 恒温培养 24 h、48 h、72 h 后, 分别用 Biolog 自动微生物鉴定系统进行鉴定, 记录鉴定结果。

## 2 结果与分析

### 2.1 浓香型大曲中酵母菌分离纯化及初步鉴定结果

本试验以泸州老窖浓香型大曲为基础, 对大曲中的酵母进行分离纯化, 并获得两株酵母菌, 分别编号为 Nj-Yeast1 和 Nj-Yeast2, 对其进行形态观察。菌落形态见图 1、图 2, 显微镜 40 倍镜观察结果见图 3、图 4。

由菌落形态和镜检结果发现, 两株菌都具有酵母菌的一般特征。Nj-Yeast1 在培养基上是呈表面光滑湿润、无假菌丝、无光泽的白色菌落, 在显微镜下是卵圆形, 多变芽殖; Nj-Yeast2 在培养基上是呈表面平滑湿润、无假菌丝、无光泽的乳白色菌落, 在显微镜下是椭圆形, 多变芽殖。经过多次分离纯化和镜检结果, 确定 Nj-Yeast1 和 Nj-Yeast2 酵母菌为较纯的菌种, 已达到 Biolog 自动微

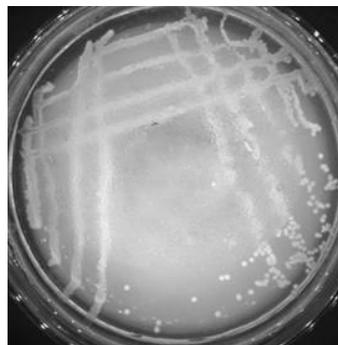


图 1 Nj-Yeast1 菌落形态

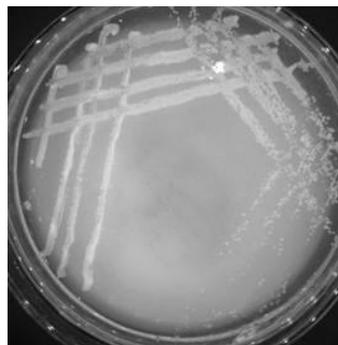


图 2 Nj-Yeast2 菌落形态

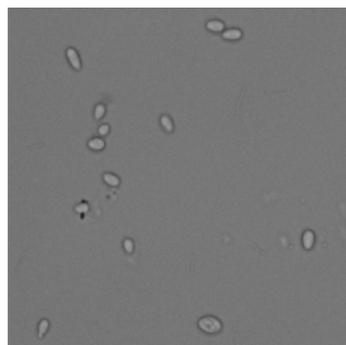


图 3 Nj-Yeast1 镜检结果

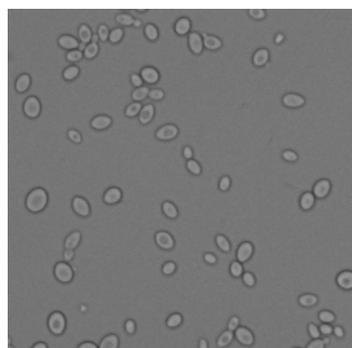


图 4 Nj-Yeast2 镜检结果

生物鉴定系统的鉴定要求的纯度。

### 2.2 Biolog 自动微生物鉴定分析结果

Biolog 自动微生物鉴定系统主要根据酵母菌对糖、醇、酸、酯、苷和大分子聚合物等多种碳源的利用情况进

行鉴定,其中A-C行基于显色反应原理,D-H行基于浊度差异原理。通过纤维光学读数仪来读取颜色变化,由计算机通过概率最大模拟法将该反应模式或“指纹图谱”与数据库相比较,将目标菌株与数据库相关菌株的特征数据进行比对,获得最大限度的匹配,确定所分析菌株的属名或种名<sup>[7]</sup>。

本试验将 Nj-Yeast1 和 Nj-Yeast2 分别接种于 YT 鉴定培养板,以 26℃ 恒温培养 24 h、48 h、72 h 后,经 Biolog 自动微生物鉴定仪检测其结果。在 48 h 时,两株菌鉴定结果都显示了 3 个重要参数:可能性(PROB)、相似性(SIM)、和位距(DIST),见图 5、图 6。

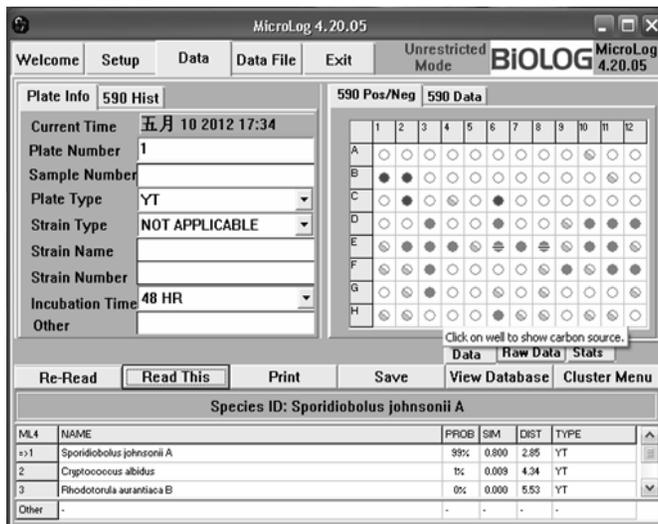


图 5 Nj-Yeast1 酵母菌鉴定结果

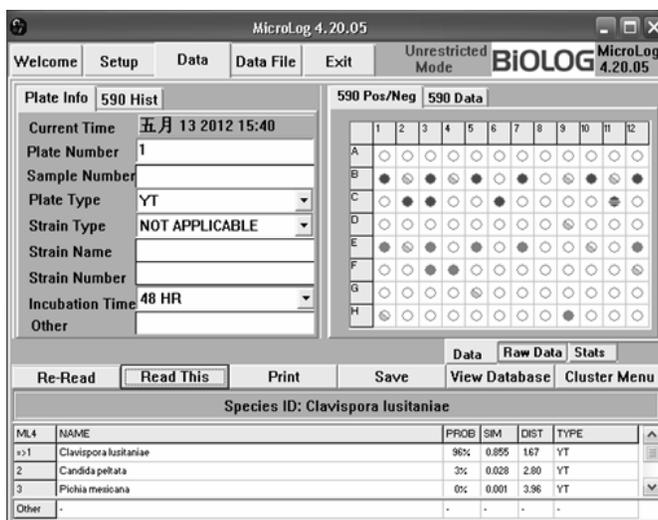


图 6 Nj-Yeast2 酵母菌鉴定结果

由试验结果分析,酵母菌的鉴定结果是出现在 48 h,可能是经过 24~48 h 培养后,菌体生长比较充分,代谢比较旺盛;48 h 以后,微生物二级代谢产物逐渐增加,所以反应没有 48 h 时旺盛。因此,一般以 48 h 的结果为准。由图 5 和图 6 发现,鉴定结果都显示为绿色状态栏

(Species ID),可知 Nj-Yeast1 和 Nj-Yeast2 菌株都得到了可能性相当大的结果。鉴定结果为:Nj-Yeast1 菌株最具可能性的菌种为 *Sporidiobolus johnsonii* A (约氏掷孢酵母 A),PROB 值为 99%、SIM 值为 0.800、DIST 值为 2.85,是理想的鉴定结果;Nj-Yeast2 菌株最具可能性的菌种为 *Clavispora lusitanae* (葡萄牙棒孢酵母),PROB 值为 96%、SIM 值为 0.791、DIST 值为 2.67,同样是较为可信的鉴定结果。

### 3 讨论

利用 Biolog 自动微生物鉴定系统对酵母菌进行鉴定,与传统微生物学鉴定方法及分子生物学手段相比,其操作简便快捷且结果准确,能节省大量工作时间,24~72 h 就能得出精确的结果,为后续微生物代谢产物研究奠定坚实的基础。由于现阶段酿酒微生物的分离鉴定还需进行大量的工作,而 Biolog 自动微生物鉴定系统不仅能够对微生物的单个菌种进行鉴定,还能够对微生物群落进行分析,值得在酿酒微生物的菌种鉴定以及菌落结构研究上进行推广使用<sup>[8-10]</sup>。

Biolog 自动微生物鉴定系统的软件将读取的 96 孔微平板反应结果与数据库匹配良好,将显示鉴定结果在绿色状态栏上;如果鉴定结果不可靠,结果栏为黄色,显示“NO ID”。每个鉴定结果主要有 3 个参数:可能性(PROB)、相似性(SIM)和位距(DIST)。其中 SIM 值和 DIST 值是两个重要的参数,DIST 值表示测试结果与数据库相应数据条的位距,SIM 值表示测试结果与数据库相应数据条的相似程度。Biolog 系统规定:酵母菌的 SIM 值在培养 24 h 时,SIM 值 $\geq 0.75$ ,培养 48 h 或 72 h 时,SIM 值应 $\geq 0.5$ ,系统给出的鉴定结果为种名,SIM 值越接近 1.00,表明鉴定结果的可靠性越高;当 SIM 值小于 0.5,但鉴定结果中属名相同的结果的 SIM 值之和大于 0.5 时,自动给出的鉴定结果为属名<sup>[5,7]</sup>。

根据本试验的结果可以看出,两株酵母菌都能准确鉴定到种,其 SIM 值 $>90\%$ ,准确率比较高,且获得的约氏掷孢酵母 A (*Sporidiobolus johnsonii* A) 和葡萄牙棒孢酵母 (*Clavispora lusitanae*) 两株酵母菌在浓香型大曲中尚未见报道,其在白酒酿制过程中的作用也需要进一步验证。因此,后期需要对两株酵母菌进行生理生化性能试验,确定其在酿酒过程中的具体作用,以期在丰富白酒工业微生物菌种库的同时,为白酒行业的可控性生产提供微生物菌种支持。

### 参考文献:

- [1] 刘宏媛,李光辉,罗惠波,等.大曲中酵母菌的分离及 Biolog 微生物系统分析鉴定[J].食品与发酵科技,2011,47(1):1-3.

(下转第 36 页)

表6 发酵条件正交试验直观分析表

试验号	A	B	C	D	酒精度(%vol)	感官评定(分)
1	18	20	3.0	9.0	6.8	65
2	18	22	3.4	10.5	10.5	78
3	18	24	3.8	12.0	12.4	86
4	18	26	4.2	13.5	12.1	80
5	18	28	4.6	15.0	10.4	70
6	20	20	3.4	12.0	10.2	84
7	20	22	3.8	13.5	12.6	80
8	20	24	4.2	15.0	11.3	74
9	20	26	4.6	9.0	8.1	73
10	20	28	3.0	10.5	7.8	72
11	22	20	3.8	15.0	11.2	84
12	22	22	4.2	9.0	9.7	72
13	22	24	4.6	10.5	12.4	81
14	22	26	3.0	12.0	8.7	78
15	22	28	3.4	13.5	12	80
16	24	20	4.2	10.5	11.4	82
17	24	22	4.6	12.0	12.4	75
18	24	24	3.0	13.5	9.2	73
19	24	26	3.4	15.0	13.2	80
20	24	28	3.8	9.0	11.6	82
21	26	20	4.6	13.5	10.9	70
22	26	22	3.0	15.0	8.8	72
23	26	24	3.4	9.0	9.5	78
24	26	26	3.8	10.5	12.2	78
25	26	28	4.2	12.0	11.9	75
酒精度(%vol)						
K1	9.940	10.100	8.260	9.140		
K2	10.000	10.300	10.580	10.360		
K3	10.800	10.960	12.000	11.120		
K4	11.700	11.000	11.280	11.360		
K5	10.660	10.740	10.840	10.980		
R	1.620	0.860	3.740	2.220		
感官评价(分)						
K1	75.800	77.000	72.000	74.000		
K2	76.600	75.400	80.000	78.200		
K3	79.000	78.400	82.000	79.600		
K4	78.400	77.800	76.600	76.600		
K5	74.600	75.800	73.800	76.000		
R	4.400	3.000	10.000	5.600		

的影响[J].食品工业科技,2010,31(7):157-161.

研究与开发,2010,31(6):122-124.

[4] 章宇,谢萌,吴晓琴,等.强化竹叶黄酮对酿造酒抗自由基和抗氧化性能的改进[J].中国食品学报,2005,5(4):34-38.

[6] 陈娟,杜木英,杨蓉生.蜂蜜桑椹酒的发酵工艺研究[J].酿酒科技,2010(8):74-48.

[5] 马荣山,代启靖,韩韬.发酵型五味子蜂蜜果酒的研制[J].食品研

(上接第32页)

食品科技,2007,23(7):5-8.

[2] 徐军,罗惠波,崔德宝,等.大曲中酵母菌的分离及其鉴定[J].酿酒,2008(3):95-96.

[7] 李金霞,程池,姚粟,等. Biolog 微生物自动分析系统-酵母菌鉴定操作规程的研究[J].食品与发酵工业,2006,32(7):50-53.

[3] 周世水,熊建春.酒曲中生香酵母的分离鉴定与产酯工艺优化[J].现代食品科技,2010,26(1):98-99.

[8] 胡桂林,王德,张雪峰,等.用 Biolog 微生物自动分析系统鉴定大曲中地衣芽孢杆菌的研究[J].酿酒,2007,34(6):32-33.

[4] 曾娟,施思,吴正云,等.浓香型白酒醅中高产酒精酵母菌的定向筛选及分子鉴定[J].中国酿造,2011(2):26-28.

[9] 李运,盛慧,赵荣华. Biolog 微生物鉴定系统在菌种鉴定中的应用[J].酿酒科技,2005(7):84-85.

[5] 袁先铃,卫春会,黄治国,等.浓香型白酒窖泥中酵母菌的分离鉴定[J].酿酒科技,2012(8):45-47.

[10] 黄治国,熊俐,罗惠波,等. Biolog 微生物自动鉴定系统在糟醅酵母菌鉴定中的应用初探[J].四川食品与发酵,2008(1):8-10.

[6] 刘磊,吴晖,刘冬梅,等.黄酒生产用酵母的分离与筛选[J].现代