

# 浓香型白酒窖泥中酵母菌的分离鉴定

袁先玲, 卫春会, 黄治国, 罗惠波, 杨晓东

(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:** 从泸州老窖浓香型白酒发酵窖池的窖泥样品中分离出了 1 株酵母菌。经菌落特征观察和镜检后, 利用 Biolog 微生物自动鉴定系统对该酵母菌进行鉴定, 结果判定, 该酵母菌为 *Pichia jadinii*(杰丁毕赤酵母)。

**关键词:** 浓香型白酒; 窖泥; 酵母菌; Biolog 鉴定

中图分类号: TS262.31; TS261.4; TS261.1; Q93-3 文献标识码: A 文章编号: 1001-9286(2012)08-0045-03

## Isolation and Identification of A Yeast Strain from Pit Mud of Luzhou-flavor Liquor

YUAN Xianling, WEI Chunhui, HUANG Zhiguo, LUO Huibo and YANG Xiaodong

(Liquor-making Biotech & Application Key Lab, Sichuan University of Science & Engineering, Zigong, Sichuan 643000, China)

**Abstract:** A yeast strain was isolated from pit mud of Luzhou-flavor liquor successfully. After observing colony characteristics and microscopic examination, we used Biolog automated microbes identification system (Biolog System) for the identification of such strain, and the results suggested that such yeast strain was *Pichia jadinii*.

**Key words:** Luzhou-flavor liquor; pit mud; yeast strains; Biolog identification

浓香型白酒酿造窖泥中栖息着大量的微生物, 它们为严格厌氧或兼性厌氧微生物, 而窖泥中微生物种类及其代谢是直接影响白酒质量的关键所在<sup>[1]</sup>。窖泥中的微生物以细菌为主, 有乳酸菌、丁酸菌、己酸菌、甲烷菌等, 同时含有一定数量的放线菌和酵母菌<sup>[2]</sup>。在浓香型白酒的发酵生产中, 酵母菌是主发酵菌群, 将糖化后的原料中的绝大部分糖转化为酒精和二氧化碳, 同时生成甘油、高级醇、酯、醛等代谢产物, 直接影响了酒的色泽、香气及口感, 决定着酒的质量。酿酒酵母菌的发酵特性因菌株的不同而存在明显差异, 菌株的不同导致利用的底物不同、生成的化学物质不同, 从而使发酵产物的风味物质存在差异, 赋予产品独特的风味<sup>[3]</sup>。

目前, 有关浓香型白酒窖泥中酵母菌分离鉴定的报道不多, 但都是通过查阅酵母菌的鉴定与特征手册与有关文献来确定酵母菌的种类, 借助 Biolog 自动微生物鉴定系统或者分子水平分析的研究比较少。有报道<sup>[2]</sup>, 窖泥中优势的酵母菌群主要有红酵母属(*Rhodotorula*)和酒香酵母属(*Brettanomyces*)。

本试验从泸州老窖浓香型白酒窖池窖泥中分离出 1 株酵母菌, 纯化培养后利用 Biolog 自动微生物鉴定系统

对其进行分类学鉴定, 确定其种属, 为酿酒微生物的分析提供基础数据和资料。

### 1 材料与方法

#### 1.1 材料、仪器

**窖泥样品:** 采自泸州老窖股份有限公司白酒生产窖池(乾隆年间开始使用的天成生作坊, 窖龄 300 年左右), 于窖底中心取样, 迅速置于冰盒运回, 于 4 °C 保藏。

**试剂:** 葡萄糖、蛋白胨、酵母膏、琼脂粉等购自成都科龙化工; BUY 培养基、YT MicroPlate 等购自美国 Biolog 公司。

**YPD 培养基:** 称取蛋白胨 20 g, 酵母膏 10 g, 琼脂 20 g, 蒸馏水 1000 mL 于烧杯中, 自然 pH 值, 加热溶解, 装于三角瓶中, 塞紧棉塞, 牛皮纸包扎, 121 °C 高压湿热灭菌 20 min, 灭菌后添加葡萄糖 20 g, 冷却至 45~50 °C 时, 于超净工作台上倒平板备用。

**BUY 培养基:** 称取 BUY 琼脂培养基 5.17 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 °C 高压湿热灭菌 15 min, 冷却至 45~50 °C 时, 于超净工作台上倒平板备用。

基金项目 四川省科技厅应用基础项目(07JY029-026) 四川理工学院引进人才项目(2007-18)。

收稿日期: 2012-05-23

作者简介: 袁先玲(1979-), 女, 重庆梁平人, 讲师, 硕士, 主要从事食品工程教学和研究工作。

通讯作者: 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 2012-07-19; 地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/52.1051.TS.20120719.1708.004.html?uid=>。

仪器:Biolog 自动微生物鉴定系统、浊度仪、电动移液器,美国 Biolog 公司;55i 生物正置显微成像系统,日本 NIKON 公司;LRH-250 生化培养箱,上海齐欣公司;SW-CJ-1F 超净工作台,苏净集团;MLS-3020 高压灭菌锅,日本 SANYO。

## 1.2 试验方法

**酵母菌分离纯化:**在无菌条件下,取 0.5 g 窖泥,加入 50 mL 无菌水,充分摇匀,自然沉淀后取上清液,得到  $10^{-2}$  稀释样。然后依次制成  $10^{-3} \sim 10^{-7}$  稀释样。吸取  $10^{-5} \sim 10^{-7}$  菌悬液各 1 mL,均匀涂布于 YPD 培养基平皿,28 °C 培养 48 h 后,根据菌种的生长状况,选取适当平皿,挑取单菌落,转接于另一平皿。依照此法转接 2~3 次,进行分离纯化,根据菌落特征及镜检确认为酵母菌后,挑取单菌落移入斜面,培养后备用。

挑取斜面上的菌落,在 BUY 培养基平板上进行十字划线接种,28 °C 下恒温培养 24 h。

Biolog 系统鉴定<sup>[4]</sup>:在无菌条件下,从 BUY 培养基平板上挑取十字接种外周的菌落,用无菌水配制成菌悬液,使其浊度调整为 28%,用移液器接种到 YT MicroPlate 上,于 28 °C 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。

## 2 结果与分析

### 2.1 窖泥中酵母菌的分离纯化

本试验以泸州老窖酒厂窖壁泥为对象,进行酵母菌的分离纯化,从样品中成功分离得到 1 株酵母菌,将该酵母菌编号为 JM1,观察其菌落特征(见图 1);对分离纯化后的 JM1 酵母菌进行镜检,结果见图 2。

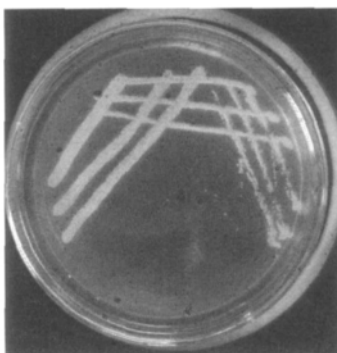


图 1 JM1 酵母菌分离纯化

图 1 表明,该菌的形态特征为:菌落为乳白色,质地均匀,菌体较湿润、较透明,表面较光滑,中央凸起,容易挑起。图 2 镜检结果表明,该菌以单个细胞存在,并未发现杂菌。经过多次分离纯化和镜检结果,确定该株酵母菌已经达到了较纯的程度,符合 Biolog 自动微生物鉴定系统的鉴定要求。

### 2.2 Biolog 自动微生物鉴定仪鉴定

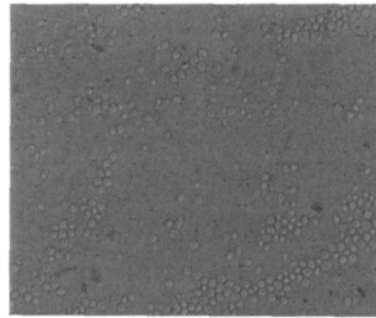


图 2 JM1 酵母菌镜检结果

将分离纯化后的 JM1 酵母菌接种到 YT 微平板上,于 28 °C 恒温培养 24 h、48 h、72 h 后,置于 Biolog 自动微生物鉴定仪上读取数据,鉴定结果为:

JM1 酵母菌在 28 °C 恒温培养 24 h 的鉴定结果(见图 3),显示为黄色状态栏“NO ID”,给出的最大可能结果为 *Pichia Canadensis* (加拿大毕赤酵母),其 SIM 值为 0.353, DIST 值为 0。

JM1 酵母菌培养 48 h 的鉴定结果(见图 4),显示为绿色状态栏(Species ID),表示已经鉴定出了可能性相当大的菌种。系统给出的最大可能结果是 *Pichia jadinii* (杰丁毕赤酵母),其 PROB 值为 98%,SIM 值为 0.978, DIST 值为 5.94。

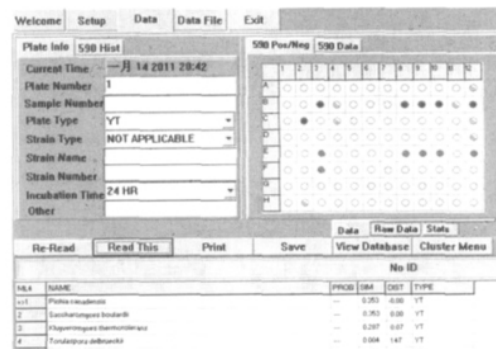


图 3 JM1 酵母菌 24 h 鉴定结果

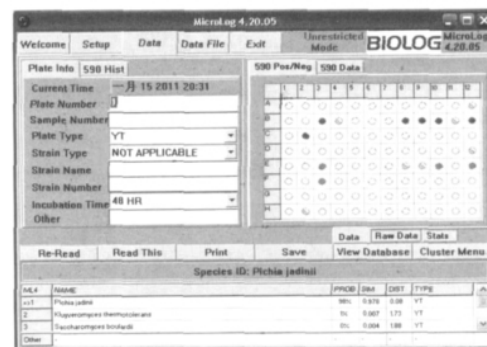


图 4 JM1 酵母菌 48 h 鉴定结果

JM1 酵母菌培养 72h 的鉴定结果(见图 5),显示为绿色状态栏(Species ID),表示已经鉴定出了可能性相当大的菌种。系统给出的最大可能结果是 *Pichia Canaden-*

sis (加拿大毕赤酵母), 其 PROB 值为 71%, SIM 值为 0.667, DIST 值为 1.00。

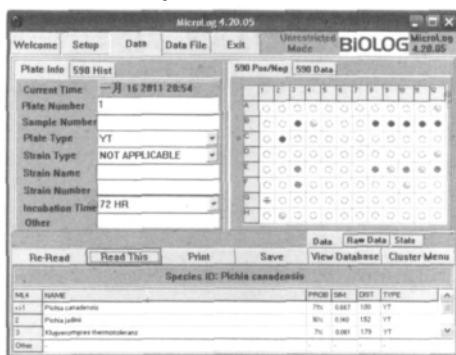


图5 JM1 酵母菌 72 h 鉴定结果

根据试验结果分析, 酵母菌的鉴定结果都是出现在 48 h 和 72 h 时, 并且 48 h 和 72 h 的鉴定结果不全相同, 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, 故该酵母菌可以确定为 *Pichia jadinii* (杰丁毕赤酵母)。

### 3 讨论

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 2 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>[4]</sup>。

(上接第 44 页)

- [7] 张芳军, 王光龙, 张宝林. 稳定二氧化氯的研究进展及发展方向[J]. 无机盐工业, 2006, 38(5): 14-26.
- [8] Shibata Takashi, Abe Koji. Chlorine dioxide generating composition[P]. JP: 2007-217239.
- [9] Fujita Hiromasa. Method for generating chlorine dioxide gas[P]. JP: 2007-001807, 2007.
- [10] Fujita Hiromasa. Method for generating chlorine dioxide gas[P]. JP: 2006-321666, 2007.
- [11] 潘彦轩, 杜晓明, 李发生. 固体稳定化二氧化氯消毒保鲜除臭剂的生产方法[P]. 中国: 97103874.0, 1998-10-14.
- [12] 李通, 罗仕中, 吴永永, 等. 活性炭改性及其对  $\text{CO}_2/\text{CH}_4$  吸附性能的研究[J]. 煤炭学报, 2011, 36(12): 2012-2016.

本试验中, 酵母菌 JM1 在培养 24 h 时, 结果栏为黄色, 显示“NO ID”, 并给出可能性很大的菌种名称; 而在培养 48 h 时, 显示出了绿色状态栏, 且给出了确定的菌种名称和可能性较大的菌种名称。根据 Biolog 操作手册和有关 Biolog 应用的资料可以知道, 这种情况时一般可以判定分离得到的 JM1 酵母菌为 *Pichia jadinii* (杰丁毕赤酵母), 且菌种的 PROB 可能性为 98%, 说明结果比较可靠。

与传统方法相比, Biolog 自动微生物鉴定系统对酵母菌的鉴定操作标准化, 且简便、快捷, 省去传统方法中的多种繁琐工作, 比如: 配制多种培养基, 做多种生化实验及辅助实验等, 为菌种鉴定节省了大量的工作时间。纯化后的酵母菌在接种后 78 h 内即可得出鉴定结果, 而且准确率也高<sup>[5-6]</sup>。

根据本研究结果可以看出, 该株酵母菌都能准确鉴定到种, 其 SIM 值  $>90\%$ , 准确率比较高, 鉴定出的酵母菌是浓香型白酒窖泥中的酿造生产菌。由此可以看出, Biolog 自动微生物鉴定系统适用于酿酒酵母的准确鉴定, 从而丰富了酿酒微生物的资源, 使其能够得到充分的认识和利用。

### 参考文献:

- [1] 罗惠波, 李浩, 黄治国, 等. BIOLOG 微生物鉴定系统在大曲微生物多样性研究中的应用初探[J]. 中国酿造, 2009, 4(3): 92-94.
- [2] 谭映月, 胡萍, 谢和. 我国白酒酿造微生物多样性的研究现状及展望[J]. 酿酒科技, 2011(11): 100-105.
- [3] 杨舒雯, 周志江, 韩焯, 等. 浓香型白酒窖泥中酵母种类的研究[J]. 食品工业科技, 2011, 32(5): 138-141.
- [4] 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.
- [5] 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.
- [6] 顾金刚. 微生物菌种资源收集、整理、保藏技术规程[M]. 北京: 中国农业出版社, 2005.
- [7] 张丽丹, 赵晓鹏, 马群, 等. 改性活性炭对苯废气吸附性能的研究[J]. 新型碳材料, 2002, 17(2): 41-44.
- [8] 翁焕新, 沈忠悦, 张兴茂, 等. 硅藻土改性对工业废水降氟效果的影响研究[J]. 硅酸盐学报, 2002, 30(3): 367-371.
- [9] 曲险峰, 郑经堂, 于维钊. 活性碳纤维催化臭氧化降解苯酚及其对碳表面性能的影响[J]. 环境污染与防治, 2007, 29(9): 664-667.
- [10] Christian L. Mangun, Zhongren Yue, and James Economy. Adsorption of Organic Contaminants from Water Using Tailored ACFs[J]. 2001, 13: 2356-2360.
- [11] Boehm H P. Some Aspects of the Surface Chemistry of Carbon Blacks and Other Carbons[J]. Carbon, 1994, 32(5): 759-769.