

皖北地区白酒大曲中酵母菌的 筛选与鉴定

孙晓璐,张新红,王明跃,张 源

(阜阳职业技术学院生化工程学院,安徽阜阳 236031)

摘要:为了分离筛选功能优良的大曲酵母菌株,采用传统分离培养方法,从皖北某白酒企业春季中温大曲中分离得到89株酵母菌,选择6株优势菌株进行复筛实验。通过菌落特征、细胞形态、生理生化特性等常规分析方法,筛选出生长优势明显,产酒精能力较强的2株酵母菌株(N4、N6)。结合18S-ITS rDNA序列测定和系统发育分析,确定N4为大隐球酵母(*Cryptococcus magnus*),N6为近玫色锁掷孢酵母(*Sporidiobolus pararoseus*),属于锁掷孢酵母属(*Sporidiobolus*)。筛选的2株酵母菌作为皖北地区白酒酵母菌的重要菌种资源,在白酒生产中具有一定的应用潜力。

关键词:大曲,酵母菌,鉴定

Selection and identification of yeast strains in Daqu liquor in the north of Anhui province

SUN Xiao-lu, ZHANG Xin-hong, WANG Ming-yue, ZHANG Yuan

(Institute of Biochemical Engineering, Fuyang Vocational and Technical College, Fuyang 236031, China)

Abstract: In this experiment, traditional method of isolation and cultivation was adopted to get excellent Daqu yeast strains. 89 dominant yeast strains had been isolated from the spring medium-high-temperature Daqu of some liquor-making enterprise in the north of Anhui province, and then 6 better-growing strains were chosen for secondary screening. Finally 2 representative yeasts strains (N4, N6), which had preponderant growth and stronger alcohol-producing abilities, were picked out through several conventional methods of analysis such as bacterial colony, cellular morphology, features of physiology and biochemistry. After using 18S-ITS rDNA sequencing and phylogenetic analysis, researchers identified N4 as *Cryptococcus magnus*, and N6 as *Sporidiobolus pararoseus*. They belonged to the genus of *Sporidiobolus*. The 2 selected yeasts strains were important strains resources for liquor-production in the north of Anhui province and they were of importance in application.

Key words: Daqu; yeasts strains; identification

中图分类号: TS261.1⁺1

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2015)24-0194-04

doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2015.24.033

中国白酒种类繁多,风格各异,其中酒曲的微生物种类和组成决定了酒的香味,正所谓“曲定酒型”。大曲制作是在开放的环境中进行的,经过自然界的气候、湿度、温度等诸多因素的影响,在酿酒过程中伴随着发酵,大曲中微生物生长繁殖,代谢出种类繁多的中间产物,进而形成大曲酒独特的风格和特色^[1]。以浓香型大曲酒为例,由于地域和环境不同,形成了两个具有代表性的流派,长江上游流域的浓郁风格的川酒和淮河流域的淡雅风格的徽酒流派。而皖北地区更是聚集了多家大中型名酒企业,如古井贡酒、金种子酒、口子窖酒等,研究和分离该地区酒曲中

微生物资源对皖北地区的白酒生产具有一定的指导意义。

酵母菌是大曲主要功能微生物菌群之一,不同类型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^[2]。关于川酒的大曲中酵母菌的研究文献较多,也分离出多株具有主导作用的酿酒酵母菌株^[3],但是关于皖北地区白酒大曲中酵母种类鲜有报道,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^[4]。

本文对皖北地区某酿酒企业提供的春季大曲进行了分离、纯化,对筛选出的优势酿酒酵母菌进行分

收稿日期:2015-05-11

作者简介:孙晓璐(1981-),女,硕士,讲师,研究方向:微生物技术,E-mail:303028607@qq.com。

基金项目:安徽省高等学校优秀青年人才基金重点项目(2013SQRL137ZD);安徽省高等学校自然科学研究项目(KJ2012B140);阜阳职业技术学院精品课程(2013zycxkc02);安徽省高等学校省级质量工程项目(2015jyxm493)。

类地位的分子生物学鉴定;将具有明显酵母菌特征的微生物进行了生理、生化实验,旨在筛选性能优良,具有工业利用价值的优势菌株,为皖北地区白酒酵母菌菌种资源的完善提供有力的数据支撑。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

白酒大曲 由皖北地区某酿酒有限公司提供春季中温大曲;孟加拉红、青霉素钠、2,3,5-氯化三苯基四氮唑(TTC) 上海化学试剂分装厂,化学纯;苯酚红、美蓝 天津博迪化工股份有限公司,化学纯;氯化钠、葡萄糖、酵母膏、牛肉膏、95%乙醇、Tris 北京奥博星生物技术有限公司,分析纯;EDTA、CTAB、SDS 国药集团化学试剂有限公司,分析纯。

AR5122分析用天平 梅特勒-托利多仪器有限公司;722紫外分光光度计 上海悦丰仪器有限公司;Avanti J-E低温离心机 美国Beckman Coulter公司;SHZ-A数显恒温振荡器 上海博讯电器有限公司;CKX41-F32FL倒置荧光显微镜 日本OLYMPUS;MP521精密pH计 上海圣科仪器设备有限公司;DHG-9030鼓风干燥箱 上海一恒仪器设备有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 大曲中酵母菌的分离与纯化 取大曲10 g,以无菌操作加入到无菌水500 mL中,取菌液涂布于YEPD固体平皿,于27 °C培养72 h,选择生长较好的菌落进行转接,后于4 °C低温保存^[5]。

1.2.2 发酵液、菌悬液的制备与菌体密度测定 将黄豆芽200 g洗净,在1000 mL中煮沸30 min,过滤得豆芽汁、补足水分至1000 mL,即得到液体发酵培养基;接2~3环菌体后,于28 °C条件下培养72 h后取10 mL

菌体发酵液进行1000 r/min低速离心分离5 min,洗涤菌体3次后,将所得菌体于10 mL 0.9%的生理盐水中,制得菌体悬浊液,依次稀释到10⁻³、10⁻²、10⁻¹倍,通过紫外分光光度计560 nm处测定吸光值,观察酵母菌的生长情况。

1.2.3 形态观察 采用美蓝染色液进行染色,制作临时装片,于100×油镜下观察,记录细胞形态特征、细胞大小、出芽情况。置于荧光倒置显微镜下进行采集,得到相关酵母菌形态图像,进行形态学观察^[6-7]。

1.2.4 呼吸强度测定 TTC培养基冷却至50 °C,覆盖在所取的实验用1 mL稀释为10⁻²的菌悬液上,待琼脂凝固后避光25 °C保存2 h,观察菌落所示颜色变化,由菌落呈现红色的深浅来判定酵母菌产酒精能力的大小,红色越深表示产酒精能力越强。

1.2.5 酵母菌基因组DNA的提取 取1 mL菌体悬浊液放入1.5 mL无菌的EP管中,13000×g离心15 min,将菌体洗涤入无菌水中,振荡后,沸水浴7 min;13000×g离心15 min后,留上清液。

1.2.6 18S rDNA基因的PCR扩增与序列测定 合成ITS序列通用引物ITS1F(5'-CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA-3')与ITS4(5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'),对18S区段进行扩增。反应体系:50 μL体系,反应程序:95 °C预变性5 min,95 °C变性30 s,55 °C退火30 s,72 °C复性30 s,共循环40个循环,72 °C下反应5 min,4 °C保存。对PCR产物经1%琼脂糖凝胶电泳检测,纯化后送上海生工公司测序^[8]。

2 结果与分析

2.1 酵母菌的形态学观察

从大曲中分离纯化得到89株酵母菌,分别进行培养,在生长过程中取其中6株优势菌株进行复筛实

表1 酵母菌的菌落特征及呼吸强度

Table 1 Colony characteristics and respiratory intensity of observation yeast

培养时间(h)	菌株	菌落特征	呼吸强度	培养时间(h)	菌株	菌落特征	呼吸强度
12	N1	-	-	48	N1	乳白色凸起、梭型	-
	N2	-	-		N2	乳白色凸起、圆滑	淡粉
	N3	-	-		N3	乳白色	-
	N4	-	-		N4	乳白色凸起、圆滑	粉红
	N5	-	-		N5	乳白色、光滑	-
	N6	-	-		N6	微黄凸起	粉红
24	N1	乳白色	-	60	N1	乳白色凸起、形成菌苔	-
	N2	乳白色	-		N2	乳白色凸起、形成菌苔	淡粉
	N3	-	-		N3	乳白色	-
	N4	乳白色	淡粉		N4	乳白色凸起、形成菌苔	粉红
	N5	-	-		N5	乳白色、光滑	-
	N6	-	-		N6	微黄凸起	粉红
36	N1	乳白色、圆滑	-	72	N1	乳白色凸起、干枯	-
	N2	乳白色、圆滑	淡粉		N2	乳白色凸起、干枯	淡粉
	N3	乳白色	-		N3	乳白色	-
	N4	乳白色、圆滑	淡粉		N4	乳白色凸起、形成菌苔	红
	N5	乳白色	-		N5	乳白色、光滑	-
	N6	微黄	淡粉		N6	微黄凸起	红

注:“-”表示无明显变化。

验,通过观察细胞的形态、菌落特征、测定呼吸强度等生理、生化实验得到相关数据见表1,并对观察结果进行分析。

选取的6株菌株酵母菌形态特征明显,分别命名为N1、N2、N3、N4、N5、N6,培养24 h后N1、N2、N4生长较快,通过表1可以看出,在发酵48 h时酵母菌生长较为迅速,在对菌体菌落进行形态观察时,可以看出这6种菌株酵母菌形态明显,菌苔表面圆滑,有凸起。但在此后的观察中发现,培养72 h时,N1、N2菌体率先出现了边缘干枯呈现萎缩状态,而N4、N6菌苔明显增厚,呈现继续生长趋势。

通过TTC染色实验,使原本呈现白色、乳白色的菌落在脱氢酶的作用下还原成红色的TF,在24 h后N4率先出现了淡粉色,随后在36 h时N2、N4、N6菌落呈现出淡粉色,说明酵母菌呼吸酶的活力大于其他几种酵母菌^[9]。N2菌株虽然呈现为淡粉色但在后期颜色变化不明显,N4、N6两种菌落的颜色随着发酵时间的延长越来越重,说明其产酒精能力强于N2,通过相关生理生化特征的筛选,在后期的研究中侧重于N4、N6两种菌株。

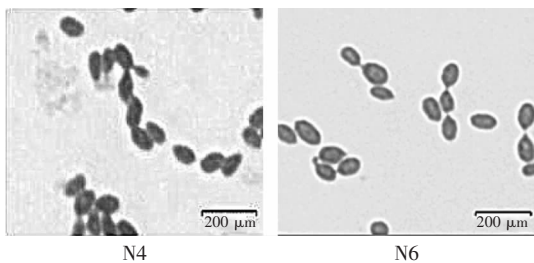


图1 优势酵母菌的形态图像
Fig.1 The advantage of yeast form

采用荧光倒置显微镜对优势酵母菌N4、N6进行观察,如图1所示,比较后得知,N4、N6菌株细胞分别呈现为卵圆形和椭圆形,颜色变化明显,芽殖,其中N6可以观察到较明显的芽殖现象。

2.2 酵母菌的生长情况

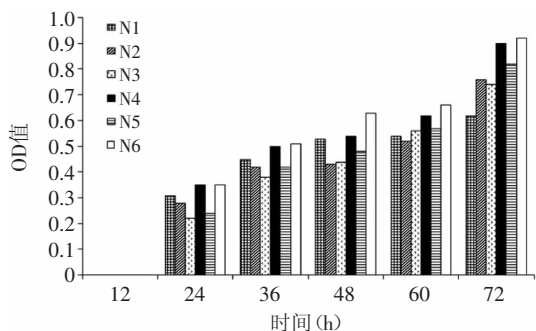


图2 酵母菌的生长情况
Fig.2 The growth of yeast

菌体生长情况的结果如图2所示,在48 h时,N6菌体生长变化很明显,OD值达到了0.63;在72 h时,N4、N6菌体生长程度明显高于其他菌株,OD值明显高于其他几种菌株分别达到0.9和0.92,进入生长对

数期。可以推断,这两种菌株具有一定的酒精耐受力,旺盛的繁殖能力亦使菌株对原料的利用率相对较高^[10]。

由此推断N4、N6酿酒酵母具有较晚的进入对数生长期的特点,随着发酵时间的延长,发酵产酒精能力越来越强,这使得这两种菌株在纷繁的微生物菌群中具有一定的抗染菌能力,可以在发酵过程中承担主导地位^[11]。

2.3 两株菌株的分子生物学鉴定

以提取的两种菌株的基因组DNA为模板,对其18S-ITS rDNA基因片段进行扩增,PCR产物经1%琼脂糖凝胶电泳检测^[12],结果如图3所示,两株菌株18S-ITS rDNA基因片段的扩增产物均为约600 bp的特异性扩增条带,分别为610 bp和589 bp,与引物设计的目标片段大小相符。

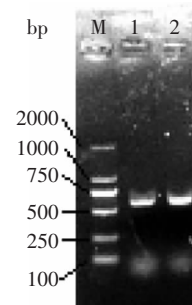


图3 N4和N6 ITS引物PCR产物琼脂糖凝胶电泳图
Fig.3 N4 and N6 ITS primer and PCR agarose gel electrophoresis map
注: M: DL2000 DNA Marker; 1: N4; 2: N6。

N4和N6的测序结果分别在NCBI里进行Blast^[13],结果显示,N4菌株与大隐球酵母(*Cryptococcus magnus*)和红冬孢酵母(*Rhodospiridium toruloides*)的相似度为99%;N6菌株与近玫色锁掷孢酵母(*Sporidiobolus pararoseus*)、*Sporobolomyces patagonicus*、*Sporobolomyces ruberrimus*的相似度分别为98%~99%、98%、98%。

为进一步明确N4、N6的分类地位,分别从Genbank里调取*Cryptococcus*属内其他物种和红冬孢酵母

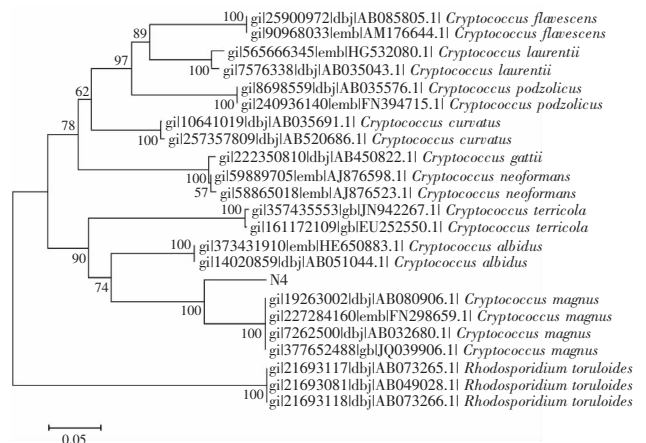


图4 N4 18S-ITS序列系统发育树
Fig.4 N4 18S-ITS sequence phylogenetic tree system

(*Rhodosporidium toruloides*) 的相关基因片段与N4进行系统发育分析。结果显示N4与大隐球酵母(*Cryptococcus magnus*)聚为一群(见图4)。从Genbank里调取近玫色锁掷孢酵母(*Sporidiobolus pararoseus*)、*Sporobolomyces patagonicus*、*Sporobolomyces ruberrimus*的相关序列与N6进行系统发育分析^[14]。结果显示N6与*Sporidiobolus pararoseus*聚为一群(见图5),亲缘关系较近。

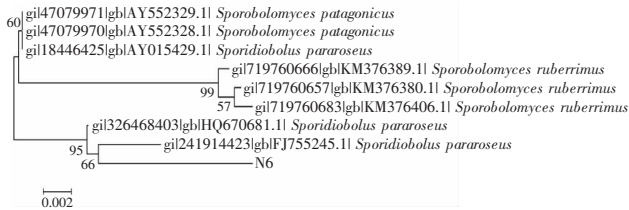


图5 N6 18S-ITS序列系统发育树

Fig.5 N6 18S-ITS sequence phylogenetic tree system

3 结论与讨论

应用分类学和分子鉴定相结合的研究方法,对皖北地区白酒大曲中酵母菌进行了分类鉴定。结果表明,选出的6株酵母菌分别为N1、N2、N3、N4、N5、N6,其中,N1、N2、N4率先生长;随着培养时间的延长N4、N6的生长优势则较为明显,培养72 h的OD值达到0.9和0.92;细胞形态呈现为卵圆形,出芽生殖,具有明显酵母菌特征;通过TTC培养,菌落显示为红色,产酒精能力较强。

在分子生物学的鉴定过程中,转录间隔区(ITS)序列是真菌rDNA中介于18S rDNA与28S rDNA之间的非编码区域^[15]。与18S rDNA和28S rDNA序列相比,真菌ITS序列的种间差异性更加明显。同时由于ITS序列两端的18S rDNA和28S rDNA序列高度保守,便于设计引物对ITS序列进行PCR扩增,这种特点使ITS非常适合于真菌物种的分子鉴定^[16],以及属内物种间或种内差异较明显的菌群间的系统发育关系分析。若两个菌株整个ITS区序列相似性 $\geq 99\%$,则可认为是同一个种;同源性大于97%,则可认为是同一个属;如果同源性小于93%~95%,则属于不同的属。

本研究从白酒中温大曲中分离出的N4和N6的18S-ITS区段序列分别与大*Cryptococcus magnus*和*Sporidiobolus pararoseus*的相似性达99%与98%,对两株菌株18S-ITS序列系统发育树的进一步分析也印证了它们的分类地位,与Blast结果基本吻合^[17]。由此,判定N4为*Cryptococcus magnus*,而N6与*Sporidiobolus pararoseus*亲缘关系较近,应当属于*Sporidiobolus*属,其准确的分类地位还需进一步研究。对于*Cryptococcus magnus*属西北农林科技大学焦红茹等^[18]在果酒酿造中对其分离及分类鉴定有过报道,提出*Cryptococcus magnus*属具有一定的发酵产酒精能力,并且耐受力很强;冯光惠等^[19]在对酿酒酵母属进行系统分类学

研究时对*Sporidiobolus*属有过报道,而在白酒大曲中N4、N6酵母菌在发酵过程中具体的代谢产物有待于进一步研究。

参考文献

- [1] 张磊,施思,张文学,等.浓香型白酒大曲中酵母的分离和鉴定[J].酿酒科技,2010,31(5):39-40.
- [2] 褚学英,惠丰立,李晓辉.大曲中主要酵母的分子鉴定[J].中国酿造,2008,27(6):15-18.
- [3] 王明跃,张文学,王海英,等.不同窖龄窖泥细菌的系统发育多样性分析[J].食品科学,2013,34(11):177-178.
- [4] 王明跃,张文学.浓香型白酒两个产区窖泥微生物群落结构分析[J].微生物学通报,2014,41(8):1498-1506.
- [5] 李艳.羊羔美酒大曲中酵母菌多样性及分子鉴定[J].食品科学,2014,5(2):144-147.
- [6] 诸葛建,王正祥.工业微生物实验技术手册[M].北京:中国轻工业出版社,1994.
- [7] 许超德,李绍兰.核酸分子系统学方法在酵母菌分类中的应用进展[J].微生物学通报,2004,31(3):126-129.
- [8] Li H,Zhang CH,Liu YL.Species attribution and distinguishing strains of *Oenococcus oeni* isolated from Chinese wines[J]. World Journal of Microbiology & Biotechnology, 2006,22(5):515-518.
- [9] 蒲春,胡沂淮,贾亚伟,等.产酯酵母的筛选及其发酵特性研究[J].酿酒科技,2013,34(4):13-15.
- [10] 吴衍庸.酒曲微生物分析与白酒香型初探[J].酿酒科技,2004,31(5):33-36.
- [11] Spano G, Massa S. Environmental stress response in wine lactic acid bacteria:beyond *Bacillus subtilis*[J]. Critical Reviews in Microbiology, 2006,32(2):77-86.
- [12] 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,2011,30(4):31-33.
- [13] Banat IM. Review:Ethanol production at elevated temperatures and alcohol concentrations:Part I-Yeasts in general[J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 1998,14(6):809-821.
- [14] Bowman J P,McCuaig R D. Biodiversity,community structural shifts,and biogeography of prokaryotes within Antarctic continental shelf sediment[J]. Applied and environmental microbiology, 2003, 69(5):2463-2483.
- [15] Fierer N, Jackson R B. The diversity and biogeography of soil bacterial communities[J]. PNAS,2006,103(3):626-631.
- [16] Ciardo DE,Schar G,Altwegg M,et al. Identification of moulds in the diagnostic laboratory,an algorithm implementing molecular and phenotypic methods[J]. Diagn Microbiol Infect Dis, 2007, 59(1):49-60.
- [17] Bridge PD. The history and application of molecular mycology[J]. Mycologist, 2002, 16(3):90-99.
- [18] 焦红茹.不同酿酒葡萄品种相关酵母菌的分离及分类鉴定[J].西北农林科技大学学报,2008,6(2):23-27.
- [19] 冯光惠.基于Rdnait-1序列酿酒酵母的系统分类学研究[J].西北农林科技大学学报,2007,11(33):59-62.

权威·核心·领先·实用·全面