

## 贵州黑糯米酒曲优良酵母菌分离筛选与鉴定

徐本刚<sup>1</sup>, 母应春<sup>1</sup>, 陈虹文<sup>1</sup>, 雷学昌<sup>1</sup>, 苏伟<sup>1,2\*</sup>

(1. 贵州大学 生命科技学院, 贵州 贵阳 550025; 2. 贵州大学南区分析测试中心, 贵州 贵阳 550025)

**摘要:** 从贵州黑糯米酒曲中分离出酵母菌312株。通过菌落形态、菌体形态观察及生理生化实验将其初步鉴定至5个属。酵母属57株、假丝酵母属14株、复膜孢酵母属28株、毕赤酵母属212株、德巴利氏酵母属1株。经TTC法、杜氏管法、发酵法及玉米糖化酶法逐级筛选, 最终筛选出1株产酒量高、产香好的菌株, 编号为Q<sub>3</sub>~J<sub>8</sub>。并提取菌株Q<sub>3</sub>~M<sub>8</sub> ITS序列进行分子生物学鉴定, Q<sub>3</sub>~J<sub>8</sub>为布拉酵母(*Saccharomyces boulardii*)。

**关键词:** 酒曲; 酵母菌; 分离; 鉴定

中图分类号: TS201.3

文献标识码: A

文章编号: 0254-5071(2012)04-0062-06

### Isolation and identification of fine saccharification molds from black glutinous rice wine starter from Guizhou

XU Bengang<sup>1</sup>, MU Yingchun<sup>1</sup>, CHEN Hongwen<sup>1</sup>, LEI Xuechang<sup>1</sup>, SU Wei<sup>1,2\*</sup>

(1. College of Life Sciences, Guizhou University, Guiyang 550525, China; 2. Southern Analysis and Test Center of Guizhou University, Guiyang 550025, China)

**Abstract:** A total number of 312 strains yeasts were obtained from black glutinous rice starter of Guizhou. By the methods of colonial morphology identification and physiology and biochemistry testing, the primary identification results showed that the strains were belonged to 5 categories. There were 57 *Saccharomyces* strains, 14 *Candida* strains, *Sacchromycopsis fibuligera* strains, 212 *Pichiapastoris* strains, 1 *Debaryomyces* strain. Screened by the methods of TTC, Durham's fermentation, zymotechnics, corn saccharification liquor, a strain numbered Q<sub>3</sub>~J<sub>8</sub> which characterized by a high ability of ethanol producing and flavor. The ITS sequences was extracted for molecular biology identification, and the result showed that it was *Saccharomyces boulardii*.

**Key words:** starter; yeast; isolation; identification

黑糯米酒是以黑糯米为原料, 经霉菌、酵母等微生物共同作用酿造而成。黑糯米酒酿造过程分为: 制曲(生麦曲、熟麦曲、酒药)、浸米、蒸饭、发酵、榨酒、勾兑、煎酒、贮存、过滤、灌瓶等工序。黑糯米酒营养丰富, 口味香、甜、醇, 可称得上酒类的佼佼者, 其酒体色如琥珀, 清亮透明, 米香协调, 酸甜适口, 酒体丰满, 具有该品特有的典型风格。产妇食用有助于滋补产后造成的身体虚弱, 有利于增加乳汁, 哺乳婴儿。黑糯米酒不仅对产妇有良好的滋补作用, 而且对于慢性病患者、恢复期病人和体虚者, 都是一种很好的营养滋补品<sup>[1]</sup>。

酿酒专家朱梅<sup>[2]</sup>对洋县黑米酒的评价: “将黑米制成黑米酒, 可以说是自有绍兴黄酒以来, 黑米酿成新型黄酒, 在我国还是一个新型创造。黑米酒的特点是酒液红褐色透明, 醇和香柔, 芳香悦人, 酸甜可口, 鲜美柔润, 有葡萄酒的风格, 有别于一般黄酒, 适度饮用后不仅能及时消除疲劳, 增进食欲, 振奋精神, 且能增加和调节人体特种营养需要。但对于黑糯米酒曲中优良菌株筛选及鉴定的文献少有报道, 因此本实验对贵州地区酒曲中分离得到的312株菌株进行了筛选鉴定, 为黑糯米酒纯种发酵奠定科学基础。

#### 1 实验仪器及材料

##### 1.1 主要仪器

电子天平: BL-75型立式压力蒸汽灭菌器; 101型电热鼓风干燥箱; VS-1300U型洁净工作台; DK-98-IIA型电热恒温水浴锅; DHD-420型电热恒温培养箱; TDL8M台式低速冷冻离心机; 舜宇BH200显微镜等。

##### 1.2 实验材料

黑糯米酒曲 (10种, 编号Q<sub>1</sub>~Q<sub>10</sub>)。Q<sub>1</sub>、Q<sub>2</sub>、Q<sub>7</sub>采购于贵州惠水县; Q<sub>3</sub>、Q<sub>4</sub>采购于黔东南地区; Q<sub>5</sub>、Q<sub>6</sub>采购于安顺地区; Q<sub>8</sub>、Q<sub>9</sub>、Q<sub>10</sub>采购于贵阳花溪区。

黑糯米: 购于贵阳花溪区农贸市场。

主要培养基: 营养琼脂、察氏培养基、PDA。

柱式真菌DNAout: 北京天恩泽基因科技有限公司。

Taq DNA聚合酶: 广州东盛生物科技有限公司。

#### 2 实验方法

##### 2.1 分离纯化

采用平板稀释法: 于酒曲内部取曲粉少量, 放入10mL无菌水中, 涡旋混合机上振荡、摇匀。用移液枪从中吸取1mL放入另一支试管, 加入9mL无菌水, 配成10<sup>-1</sup>菌悬液。依此类推, 配制成10<sup>-2</sup>、10<sup>-3</sup>、10<sup>-4</sup>……菌悬液。振摇后, 分别从上述试管中吸取200μL菌液涂布于孟加拉红培养基中, 每个稀释度设置3个重复。28℃恒温培养48h~72h, 挑取平板上带有个体特征为酵母菌的单菌落分别接种于PDA培养

收稿日期: 2012-01-14

基金项目: 贵州大学研究生创新基金(校研究农2011014), 贵阳市科技局[(2010)筑科农合同字第8-1号]

作者简介: 徐本刚(1986-), 男, 在读硕士研究生, 研究方向为食品微生物。苏伟\*, 副教授, 硕导, 通讯作者。

基斜面上, 28℃恒温培养, 待菌落长出后, 检查其菌落形态特点是否一致<sup>[3]</sup>。

## 2.2 酵母菌鉴定

根据形态学特征、生理生化特征, 按Ladder分类系统, 参照《The yeast》<sup>[4-5]</sup>和《常见与常用真菌》<sup>[6]</sup>的方法鉴定。

### 2.2.1 形态学实验

细胞学形态: 取菌龄2d~3d的菌株移种于麦芽汁培养液中, 28℃下培养3d后显微镜观察细胞形状、无性繁殖方式、测量细胞大小(测量20个细胞的长、宽)、计算各种细胞形态的百分率。

培养性状: 取新鲜酵母菌培养物, 移种于YPD固体培养基及麦芽汁液体培养基中, 28℃下培养3d后观察菌落的色泽、质地、表面有否褶皱和边缘形状、培养液的浑浊与否、浮膜、环或岛、沉淀物的情况。

子囊孢子的形成和形态: 根据酵母菌的有性生殖主要形成子囊孢子, 可将其划分为生孢子酵母和无孢子酵母。取待鉴定菌株用YPD或者麦芽汁琼脂斜面移接2~3代, 再以生长旺盛的培养物移种于产孢培养基中, 于25℃~28℃恒温培养3d~5d后涂片观察。2~3周后, 如不生孢子则改用石膏块培养基。涂片观察子囊孢子的形状和表面纹饰, 测定孢子大小和生孢子百分率、每个子囊内的孢子数、孢子结合状态以及试探枝生长情况等<sup>[7]</sup>。

假菌丝的形成和形态: 分离纯化酵母菌用划线接种于薄层玉米粉琼脂培养基上, 其上盖上灭菌盖片(盖片可用75%vol乙醇浸泡后, 火焰烧去乙醇, 待盖片冷却后盖上), 25℃~28℃培养3d~5d后, 用低倍显微镜观察记录盖片下划线两旁是否形成假菌丝。

掷孢子的形成: 将酵母菌接种于PDA斜面或平板, 于25℃~28℃培养3d~7d后, 观察斜面相对的试管壁或皿盖上是形成和菌落形状相同之镜像, 如能形成, 则观察掷孢子的形状和大小。

### 2.2.2 生理生化实验

包括糖类发酵实验、碳源同化实验、氮源同化实验、类淀粉化合物形成测定、对高浓度D-葡萄糖生长测定、尿素分解实验等常规的生理生化反应实验。

## 2.3 优良酵母菌筛选

### 2.3.1 初筛

TTC平板初筛法<sup>[8]</sup>: 将供试菌株对应点接于TTC下层培养基平板上, 28℃培养2d~3d。将灭菌TTC上层培养基冷却至60℃, 加入TTC染色剂溶液, 混匀, 立即倾于长出菌落的TTC平板上, 28℃培养2h~3h, 观察菌落变色快慢及颜色深浅。每株菌株作3个重复挑取变色快、颜色深、性状良好的菌株接入YPD斜面培养基保藏。

杜氏发酵管初筛法<sup>[9]</sup>: 在18mm×180mm试管中加入10mL麦芽汁发酵培养基, 放入倒置的12mm×75mm发酵管,

湿热灭菌。取供试菌株一环, 接种于杜氏管底部, 28℃培养2d~3d, 观察产气情况, 按气柱高低依次排列, 挑选产气多的菌株。

### 2.3.2 三角瓶发酵法复筛<sup>[10]</sup>

将初筛菌株活化后, 在YPD液体培养基中培养24h接入麦芽汁发酵培养基中, 基于28℃发酵3d, 测定发酵液中CO<sub>2</sub>产量、酒精产量, 挑选产量性状较为优良的菌株, 重复试验3次。

### 2.3.3 玉米糖化醪筛选

制作玉米糖化醪: 玉米粉10g, 水60g, 加热糊化20min~30min, 待温度降到70℃加入淀粉酶1%(500g干料加5g酶), 液化30min, 再加入糖化酶0.8%, 60℃恒温糖化30min。过滤, 调节至13°Bx, 用硫酸铵调pH值为4.5, 灭菌30min。

接种一环斜面酵母于12mL玉米糖化醪的大试管中, 28℃恒温培养24h。再将12mL培养液全部转接于装有150mL玉米糖化醪的500mL三角瓶中(接种量为8%), 28℃继续培养3d, 测其发酵完毕时的pH值、固形物、总酸、还原糖、酒精度等指标值。

固形物含量、总酸、还原糖、酒精度等指标的检测均按GB/T13662-2008执行。CO<sub>2</sub>失重、杂醇油含量按赵光鳌主编《黄酒生产分析检验》中的方法测定。

## 2.4 优良酵母菌ITS序列分析

### 2.4.1 酵母菌基因组DNA提取

采用北京天恩泽基因科技有限公司的柱式真菌DNAout试剂盒提取。

### 2.4.2 基因组DNA纯度及浓度测定。

采用紫外分光光度计法测定基因组DNA纯度及浓度。DNA的OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub>比值应在1.8~1.9之间。DNA的浓度(mg/mL)计算方法: OD<sub>260</sub>×50×稀释倍数, 用TE将DNA的浓度调节为1mg/mL。

### 2.4.3 优良酵母菌ITS序列PCR扩增

引物设计: 采用通用引物ITS4(5'-TCCTCCGCTTA-TTGATATGC-3')和ITS5(5'-GGAAGTAAAAGTCGTAA-CAAGG-3')。

反应体系见表1。

表1 优良酵母菌ITS序列PCR扩增反应体系  
Table 1. The PCR amplification system of fine yeast ITS sequences

| 体系组成                              | 体积    |
|-----------------------------------|-------|
| 10×PCR buffer(含Mg <sup>2+</sup> ) | 5μL   |
| 引物NL1(10μmol/L)                   | 2μL   |
| 引物NL4(10μmol/L)                   | 2μL   |
| 10mM dNTP(2.5mmol/L)              | 4μL   |
| DNA模板                             | 2μL   |
| ddH <sub>2</sub> O                | 34μL  |
| Taq酶(5U/μL)                       | 1μL   |
| PCR反应体系的总体积                       | 501μL |

反应条件见表2。

表2 优良酵母菌ITS序列PCR扩增条件  
Table 2. PCR amplification conditions of fine yeast ITS sequences

| 序号 | 反应  | 温度  | 时间    | 循环次数  |
|----|-----|-----|-------|-------|
| 1  | 预变性 | 95℃ | 3min  | 30个循环 |
| 2  | 变性  | 95℃ | 1min  |       |
| 3  | 退火  | 51℃ | 1min  |       |
| 4  | 延伸  | 72℃ | 1min  |       |
| 5  | 后延伸 | 72℃ | 10min |       |

PCR扩增产物检测 :PCR扩增产物以1%琼脂糖凝胶电泳检测 ,第1泳道加入D2000(DNAMarker) ,若条带在500bp~750bp ,即为所需目的片段。

PCR产物的DNA测序 :PCR扩增产物由南京金斯瑞生物科技有限公司测序。

ITS序列分析 :以NCBI数据库中Blast程序进行序列同源性比对 ,用MEGA5.05软件绘制系统发育树图谱 ,并结合菌株的形态学特征鉴定目的菌株。

3 结果与分析

3.1 酵母菌分离鉴定结果

从贵州黑糯米酒曲(10个样品)中共分离纯化出312株酵母菌 ,将其移入麦芽汁琼脂斜面培养 ,编号保存备用。从形态学和生理生化实验将酵母菌鉴定至属 ,由表3、表4可知 ,初步将酵母鉴定至5个属。

表3 酵母的菌落形态和细胞形态  
Table 3. The colonial morphology and cell morphology of yeasts

| 菌株   | JA      | JB      | JC      | JD     | JE   |
|------|---------|---------|---------|--------|------|
| 菌落色泽 | 乳白色或乳黄色 | 乳白色或乳黄色 | 乳白      | 白色     | 白色   |
| 菌落表面 | 光滑湿润    | 干燥褶皱凸起  | 干燥不光滑褶皱 | 干燥褶皱   | 干燥褶皱 |
| 细胞形态 | 卵形      | 卵形      | 卵形      | 卵形-腊肠形 | 卵形   |
| 无性繁殖 | 芽殖      | 芽殖      | 芽殖      | 芽殖     | 芽殖   |
| 子囊孢子 | 球形      | -       | 帽子形     | 帽子形    | 圆形   |
| 假丝   | +/-     | +       | +       | +      | +    |
| 真菌丝  | -       | -       | +       | +/-    | +    |
| 株数   | 57      | 14      | 28      | 212    | 1    |

注 :“+”表示有菌丝形成 ;“-”表示不形成子囊孢子、菌丝。

JA类总共57株 ,初步鉴定为酵母属(*Saccharomyces*) ;JB类共14株 ,初步鉴定为假丝酵母属(*Candida*) ;JC类总共28株 ,初步鉴定为复膜孢酵母属(*Saccharomycopsis*) ;JD类总共212株 ,初步鉴定为毕赤酵母属(*Pichia*) ;JE类1株 ,初步鉴定为德巴利氏酵母属(*Debaryomyces*)。

3.2 优良酿酒酵母菌株筛选

3.2.1 TTC法初筛

表4 酵母菌属的生理生化鉴定结果  
Table 4. Thephysiology and biochemistry identification results of saccharomycetes

| 菌株   | JA  | JB    | JC     | JD    | JE      |
|------|-----|-------|--------|-------|---------|
| 发酵   | +   | +/-   | +/-    | +/-   | +       |
| DBB  | -   | -     | -      | -     | -       |
| 木糖   | -   | +     | -      | +     | +       |
| 蔗糖   | -   | +     | +      | +     | +       |
| 蜜二糖  | W   | -     | -      | -     | -       |
| 甘露醇  | -   | +     | W      | +     |         |
| 硝酸盐  | -   | -     | -      | -     | -       |
| 葡萄糖  | +   | W     | +      | +     | +       |
| 脲酶   | -   | -     | -      | -     | -       |
| 麦芽糖  | -   | W     | +      | -     | +       |
| 半乳糖  | W   | W     | -      | +     | -       |
| 棉仔糖  | W   | -     | -      | -     | -       |
| 乳糖   | -   | -     | -      | -     | +       |
| 肌醇   | -   | +     | -      | -     | -       |
| 淀粉   | -   | -     | -      | -     | -       |
| 鉴定结果 | 酵母属 | 假丝酵母属 | 复膜孢酵母属 | 毕赤酵母属 | 德巴利氏酵母属 |

注 :“+”表示为阳性 ;“-”表示为阴性 ;“+/-”表示阴性或阳性 ;“W”表示为弱阳性。

从已鉴定至酵母属的57株菌株中筛选产酒能力强的优良菌株。用接种针均匀接种于TTC下层培养基 ,28℃培养长出菌落后倒入TTC上层培养基后 ,在30℃下避光保温2h~3h。观察菌落颜色变化情况 ,如图1所示。

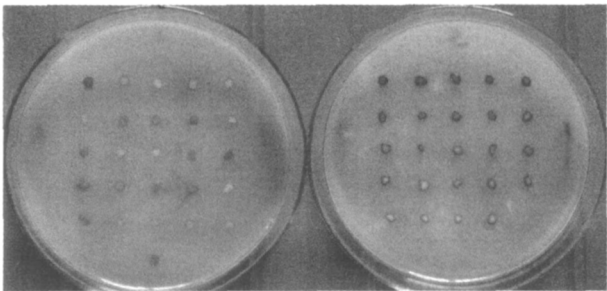


图1 酵母菌在TTC平板上显色  
Figure 1. Color development on TTC plate of the yeast

TTC(2,3,5-氯化三苯基四氮唑)是一种显色剂 ,它能对酵母的代谢产物发生呈色反应 ,通过它可以判断酵母中呼吸酶活力大小 ,即酵母产酒精能力的高低。在一定培养基上培养的酵母菌落覆盖一层TTC显色剂 ,恒温培养2h~3h以后TTC会显不同的颜色 ,产酒精能力强的酵母会显深红色 ,次之显粉红色 ,微红色或不显色为野生酵母<sup>[8]</sup>。根据颜色变化从每个平板中记下颜色较深的株菌 ,共得到22株酵母菌 ,用于杜氏管发酵筛选的出发菌株。

3.2.2 杜氏管法初筛

表5 高发酵力酵母菌杜氏管法初筛

Table 5. Comparison the property of high fermentation strains in Du-canalculus

| 菌株<br>编号                        | 培养<br>时间/h | 培养温度/℃ |      |      |      |      |
|---------------------------------|------------|--------|------|------|------|------|
|                                 |            | 20     | 25   | 28   | 35   | 40   |
| Q <sub>2</sub> -J <sub>1</sub>  | 12         | ++++   | ++++ | ++++ | ++++ | ++++ |
| Q <sub>2</sub> -J <sub>1</sub>  | 24         | ++++   | ++++ | ++++ | ++++ | ++++ |
| Q <sub>2</sub> -J <sub>1</sub>  | 48         | ++++   | ++++ | ++++ | ++++ | ++++ |
| Q <sub>2</sub> -J <sub>9</sub>  | 12         | +++    | ++++ | ++++ | ++++ | ++++ |
| Q <sub>2</sub> -J <sub>9</sub>  | 24         | ++++   | ++++ | ++++ | ++++ | ++++ |
| Q <sub>2</sub> -J <sub>9</sub>  | 48         | ++++   | ++++ | ++++ | ++++ | ++++ |
| Q <sub>2</sub> -J <sub>11</sub> | 12         | -      | -    | -    | -    | -    |
| Q <sub>2</sub> -J <sub>11</sub> | 24         | -      | +    | ++   | +    | -    |
| Q <sub>2</sub> -J <sub>11</sub> | 48         | ++     | ++++ | ++++ | ++++ | ++++ |
| Q <sub>2</sub> -J <sub>14</sub> | 12         | ++++   | ++++ | ++++ | ++++ | ++++ |
| Q <sub>2</sub> -J <sub>14</sub> | 24         | ++++   | ++++ | ++++ | ++++ | ++++ |
| Q <sub>2</sub> -J <sub>14</sub> | 48         | ++++   | ++++ | ++++ | ++++ | ++++ |
| Q <sub>2</sub> -J <sub>15</sub> | 12         | -      | -    | -    | +    | -    |
| Q <sub>2</sub> -J <sub>15</sub> | 24         | +      | ++   | +++  | ++++ | ++   |
| Q <sub>2</sub> -J <sub>15</sub> | 48         | ++++   | ++++ | ++++ | ++++ | ++++ |
| Q <sub>2</sub> -J <sub>16</sub> | 12         | ++++   | ++++ | ++++ | ++++ | ++++ |
| Q <sub>2</sub> -J <sub>16</sub> | 24         | ++++   | ++++ | ++++ | ++++ | ++++ |
| Q <sub>2</sub> -J <sub>16</sub> | 48         | ++++   | ++++ | ++++ | ++++ | ++++ |
| Q <sub>2</sub> -J <sub>21</sub> | 12         | ++++   | ++++ | ++++ | ++++ | ++++ |
| Q <sub>2</sub> -J <sub>21</sub> | 24         | ++++   | ++++ | ++++ | ++++ | ++++ |
| Q <sub>2</sub> -J <sub>21</sub> | 48         | ++++   | ++++ | ++++ | ++++ | ++++ |
| Q <sub>2</sub> -J <sub>26</sub> | 12         | ++++   | ++++ | ++++ | ++++ | ++++ |
| Q <sub>2</sub> -J <sub>26</sub> | 24         | ++++   | ++++ | ++++ | ++++ | ++++ |
| Q <sub>2</sub> -J <sub>26</sub> | 48         | ++++   | ++++ | ++++ | ++++ | ++++ |
| Q <sub>3</sub> -J <sub>1</sub>  | 12         | ++++   | ++++ | ++++ | ++++ | ++++ |
| Q <sub>3</sub> -J <sub>1</sub>  | 24         | ++++   | ++++ | ++++ | ++++ | ++++ |
| Q <sub>3</sub> -J <sub>1</sub>  | 48         | ++++   | ++++ | ++++ | ++++ | ++++ |
| Q <sub>3</sub> -J <sub>2</sub>  | 12         | ++++   | ++++ | ++++ | ++++ | ++++ |
| Q <sub>3</sub> -J <sub>2</sub>  | 24         | ++++   | ++++ | ++++ | ++++ | ++++ |
| Q <sub>3</sub> -J <sub>2</sub>  | 48         | ++++   | ++++ | ++++ | ++++ | ++++ |
| Q <sub>3</sub> -J <sub>3</sub>  | 12         | ++++   | ++++ | ++++ | ++++ | ++++ |
| Q <sub>3</sub> -J <sub>3</sub>  | 24         | ++++   | ++++ | ++++ | ++++ | ++++ |
| Q <sub>3</sub> -J <sub>3</sub>  | 48         | ++++   | ++++ | ++++ | ++++ | ++++ |
| Q <sub>3</sub> -J <sub>4</sub>  | 12         | +++    | ++++ | ++++ | ++++ | ++++ |
| Q <sub>3</sub> -J <sub>4</sub>  | 24         | ++++   | ++++ | ++++ | ++++ | ++++ |
| Q <sub>3</sub> -J <sub>4</sub>  | 48         | ++++   | ++++ | ++++ | ++++ | ++++ |
| Q <sub>3</sub> -J <sub>6</sub>  | 12         | ++++   | ++++ | ++++ | ++++ | ++++ |
| Q <sub>3</sub> -J <sub>6</sub>  | 24         | ++++   | ++++ | ++++ | ++++ | ++++ |
| Q <sub>3</sub> -J <sub>6</sub>  | 48         | ++++   | ++++ | ++++ | ++++ | ++++ |
| Q <sub>3</sub> -J <sub>7</sub>  | 12         | ++++   | ++++ | ++++ | ++++ | ++++ |
| Q <sub>3</sub> -J <sub>7</sub>  | 24         | ++++   | ++++ | ++++ | ++++ | ++++ |
| Q <sub>3</sub> -J <sub>7</sub>  | 48         | ++++   | ++++ | ++++ | ++++ | ++++ |
| Q <sub>3</sub> -J <sub>8</sub>  | 12         | ++++   | ++++ | ++++ | ++++ | ++++ |
| Q <sub>3</sub> -J <sub>8</sub>  | 24         | ++++   | ++++ | ++++ | ++++ | ++++ |
| Q <sub>3</sub> -J <sub>8</sub>  | 48         | ++++   | ++++ | ++++ | ++++ | ++++ |

续表

| 菌株<br>编号                        | 培养<br>时间/h | 培养温度/℃ |      |      |      |      |
|---------------------------------|------------|--------|------|------|------|------|
|                                 |            | 20     | 25   | 28   | 35   | 40   |
| Q <sub>3</sub> -J <sub>9</sub>  | 12         | +      | ++   | ++++ | ++++ | ++++ |
| Q <sub>3</sub> -J <sub>9</sub>  | 24         | ++++   | ++++ | ++++ | ++++ | ++++ |
| Q <sub>3</sub> -J <sub>9</sub>  | 48         | ++++   | ++++ | ++++ | ++++ | ++++ |
| Q <sub>4</sub> -J <sub>1</sub>  | 12         | ++     | ++++ | ++++ | ++++ | ++++ |
| Q <sub>4</sub> -J <sub>1</sub>  | 24         | ++++   | ++++ | ++++ | ++++ | ++++ |
| Q <sub>4</sub> -J <sub>1</sub>  | 48         | ++++   | ++++ | ++++ | ++++ | ++++ |
| Q <sub>4</sub> -J <sub>2</sub>  | 12         | ++++   | ++++ | ++++ | ++++ | ++++ |
| Q <sub>4</sub> -J <sub>2</sub>  | 24         | ++++   | ++++ | ++++ | ++++ | ++++ |
| Q <sub>4</sub> -J <sub>2</sub>  | 48         | ++++   | ++++ | ++++ | ++++ | ++++ |
| Q <sub>4</sub> -J <sub>3</sub>  | 12         | ++     | ++++ | ++++ | ++++ | ++++ |
| Q <sub>4</sub> -J <sub>3</sub>  | 24         | ++++   | ++++ | ++++ | ++++ | ++++ |
| Q <sub>4</sub> -J <sub>3</sub>  | 48         | ++++   | ++++ | ++++ | ++++ | ++++ |
| Q <sub>4</sub> -J <sub>4</sub>  | 12         | ++     | +++  | +++  | ++++ | ++++ |
| Q <sub>4</sub> -J <sub>4</sub>  | 24         | ++++   | ++++ | ++++ | ++++ | ++++ |
| Q <sub>4</sub> -J <sub>4</sub>  | 48         | ++++   | ++++ | ++++ | ++++ | ++++ |
| Q <sub>4</sub> -J <sub>5</sub>  | 12         | ++     | ++++ | ++++ | ++++ | ++++ |
| Q <sub>4</sub> -J <sub>5</sub>  | 24         | ++++   | ++++ | ++++ | ++++ | ++++ |
| Q <sub>4</sub> -J <sub>5</sub>  | 48         | ++++   | ++++ | ++++ | ++++ | ++++ |
| Q <sub>4</sub> -J <sub>6</sub>  | 12         | ++     | ++++ | ++++ | ++++ | ++++ |
| Q <sub>4</sub> -J <sub>6</sub>  | 24         | ++++   | ++++ | ++++ | ++++ | ++++ |
| Q <sub>4</sub> -J <sub>6</sub>  | 48         | ++++   | ++++ | ++++ | ++++ | ++++ |
| Q <sub>4</sub> -J <sub>7</sub>  | 12         | ++++   | ++++ | ++++ | ++++ | ++++ |
| Q <sub>4</sub> -J <sub>7</sub>  | 24         | ++++   | ++++ | ++++ | ++++ | ++++ |
| Q <sub>4</sub> -J <sub>7</sub>  | 48         | ++++   | ++++ | ++++ | ++++ | ++++ |
| Q <sub>4</sub> -J <sub>8</sub>  | 12         | ++++   | ++++ | ++++ | ++++ | ++++ |
| Q <sub>4</sub> -J <sub>8</sub>  | 24         | ++++   | ++++ | ++++ | ++++ | ++++ |
| Q <sub>4</sub> -J <sub>8</sub>  | 48         | ++++   | ++++ | ++++ | ++++ | ++++ |
| Q <sub>4</sub> -J <sub>10</sub> | 12         | +++    | +++  | ++++ | ++++ | ++++ |
| Q <sub>4</sub> -J <sub>10</sub> | 24         | ++++   | ++++ | ++++ | ++++ | ++++ |
| Q <sub>4</sub> -J <sub>10</sub> | 48         | ++++   | ++++ | ++++ | ++++ | ++++ |

注 根据杜氏管中产气多少分为5个等级:1.“++++”表示杜氏管中充满气体 2.“+++”表示杜氏管中充满3/4气体 3.“++”表示杜氏管中充满1/2气体 4.“+”表示杜氏管中充满1/4气体 5.“-”表示杜氏管中没有气体。

酵母菌能利用麦芽汁中的葡萄糖进行酒精发酵,转变成酒精和二氧化碳,发酵能力越强所产二氧化碳气体也越多<sup>[11-12]</sup>。采用杜氏管法可直观地观察到每株酵母菌产二氧化碳的量,从而反映出发酵力的大小。由表3可见,菌株Q<sub>2</sub>-J<sub>1</sub>、Q<sub>2</sub>-J<sub>14</sub>、Q<sub>3</sub>-J<sub>8</sub>等菌株所对应杜氏管中都充满气体,说明这些菌株酒精发酵能力强,温度适应性强,无论在20℃低温还是40℃高温均表现出了较强发酵力。而菌株Q<sub>3</sub>-J<sub>9</sub>、Q<sub>4</sub>-J<sub>1</sub>、Q<sub>4</sub>-J<sub>10</sub>等菌株所对应的杜氏管中未充满气体或某个温度下未充满气体,表明这些菌株酒精发酵力不够强或温度适应性差。淘汰Q<sub>3</sub>-J<sub>9</sub>、Q<sub>4</sub>-J<sub>1</sub>、Q<sub>4</sub>-J<sub>10</sub>等产气较少或温度适应性差的菌株,筛选出14株发酵力较强菌株。

3.2.3 发酵复筛实验

表6 高发酵力酵母菌三角瓶复筛结果  
Table 6. The screening results of yeasts with nice fermentation capacity in triangular flask

| 序号 | 菌株编号                            | CO <sub>2</sub> 失重 /g | 酒精体积分数/%  | 杂醇油含量 /(g·L <sup>-1</sup> ) |
|----|---------------------------------|-----------------------|-----------|-----------------------------|
| 1  | Q <sub>2</sub> -J <sub>1</sub>  | 4.15±0.05             | 2.95±0.07 | 0.324±0.025                 |
| 2  | Q <sub>2</sub> -J <sub>14</sub> | 4.10±0.01             | 2.85±0.07 | 0.344±0.001                 |
| 3  | Q <sub>2</sub> -J <sub>16</sub> | 4.00±0.28             | 3.10±0.01 | 0.339±0.030                 |
| 4  | Q <sub>2</sub> -J <sub>21</sub> | 4.20±0.14             | 2.40±0.02 | 0.302±0.061                 |
| 5  | Q <sub>2</sub> -J <sub>26</sub> | 4.10±0.14             | 3.10±0.01 | 0.359±0.005                 |
| 6  | Q <sub>3</sub> -J <sub>1</sub>  | 4.30±0.28             | 3.20±0.14 | 0.362±0.023                 |
| 7  | Q <sub>3</sub> -J <sub>2</sub>  | 4.15±0.07             | 3.30±0.02 | 0.370±0.014                 |
| 8  | Q <sub>3</sub> -J <sub>3</sub>  | 3.65±0.21             | 3.55±0.07 | 0.390±0.007                 |
| 9  | Q <sub>3</sub> -J <sub>6</sub>  | 4.25±0.07             | 3.30±0.01 | 0.403±0.069                 |
| 10 | Q <sub>3</sub> -J <sub>7</sub>  | 4.10±0.14             | 3.20±0.14 | 0.453±0.040                 |
| 11 | Q <sub>3</sub> -J <sub>8</sub>  | 4.35±0.07             | 4.10±0.14 | 0.343±0.020                 |
| 12 | Q <sub>4</sub> -J <sub>2</sub>  | 4.10±0.14             | 4.00±0.02 | 0.402±0.003                 |
| 13 | Q <sub>4</sub> -J <sub>7</sub>  | 4.25±0.07             | 3.90±0.14 | 0.375±0.049                 |
| 14 | Q <sub>4</sub> -J <sub>8</sub>  | 4.10±0.14             | 4.00±0.01 | 0.408±0.014                 |

CO<sub>2</sub>失重和酒精体积分数可间接反映酵母菌进行酒精发酵的能力。CO<sub>2</sub>失重越多或酒精体积分数越高表明菌株的发酵力越强。杂醇油是一类高沸点的混合物,是淡黄色至棕褐色的透明液体,具有特殊的强烈的刺激性臭气味,白酒中如果杂醇油含量过高(超过国家规定的卫生标准),对人体有毒害作用,它对人体的中毒和麻醉作用比乙醇强,能使神经系统充血,使人感觉头痛。其毒性随分子量增大而加剧。杂醇油在人体内的氧化速度比乙醇慢,在人体内停留时间长。杂醇油含量过高,不仅对人体有害,而且还给酒的风味带来邪杂味<sup>[13]</sup>。从表4中可知,菌株Q<sub>2</sub>-J<sub>16</sub>、Q<sub>3</sub>-J<sub>1</sub>、Q<sub>3</sub>-J<sub>8</sub>等6株菌株经三角瓶发酵后CO<sub>2</sub>失重高,酒精体积分数

也较高。说明这几株菌产酒精能力强,同时产杂醇油相对较低,因此选取其进行下一步筛选试验的出发菌株。

3.2.4 酵母菌玉米糖化醪筛选实验

在酸性环境中更适宜酵母菌生长繁殖,最适pH值为4.5~5.5。即使pH值为2.5时,酵母仍能繁殖。在蒸馏酒生产中,收集前次生产的酵母接种时,为减少污染,可加酸调节发酵液pH值(至3.5~4.0左右),pH值降低亦可减慢酵母菌繁殖速度,因此,在蒸馏酒生产中,为了在适当的时间得到发酵力强的酵母,可在其它条件不变的情况下,通过降低醪液pH值及培养温度而达到<sup>[14]</sup>。黄酒标准中,黄酒固形物的主要成分为蛋白质及其分解产生的肽类、氨基酸及糖分、糊精等有机质,此类有机物在酒酸度、精度等因素作用下,产生某些特定排列结构形态,形成黄酒中的有机类固形物<sup>[15]</sup>。其与酒的香气、口感及风格密切相关。总酸与黄酒的口感密切相关,总酸不宜过高。将通过三角瓶复筛实验所得菌株Q<sub>3</sub>-J<sub>8</sub>、Q<sub>2</sub>-J<sub>16</sub>、Q<sub>3</sub>-J<sub>1</sub>等接种于玉米糖化醪发酵3d后对发酵醪进行感官评分,并检测发酵醪的pH值、固形物、总酸、还原糖及酒精度含量结果如表5所示。由表5可知,对发酵醪的感官评分中最低分为(61±4)分,最高分为(81±2)分,Q<sub>3</sub>-J<sub>8</sub>的得分最高为81±2。发酵液的pH值都处于一个较低的水平,在3.19~3.28范围,各个菌株间的差异不大故有利于酵母菌的筛选。从总固形物及还原糖含量可知菌株Q<sub>3</sub>-J<sub>8</sub>所发酵的发酵醪中总固形物含量较低,还原糖含量最低。即玉米糖化醪中的糖分被菌株利用得最多,这表明菌株Q<sub>3</sub>-J<sub>8</sub>对糖分的利用最强。从发酵液的总酸来看Q<sub>3</sub>-J<sub>8</sub>也处在一个较低水平。酒精度含量显示Q<sub>2</sub>-J<sub>26</sub>与Q<sub>3</sub>-J<sub>8</sub>的发酵醪最高。综合考虑,菌株Q<sub>3</sub>-J<sub>8</sub>所发酵的发酵醪不仅感官良好且酒精度也最高,因此Q<sub>3</sub>-J<sub>8</sub>即为本次筛选所得的优良产酒酵母菌。

表7 酵母菌玉米糖化醪复筛实验  
Table 7. Screening experiments of corn saccharification liquorusing yaeasts

| 序号 | 菌株                              | 感官评分(100分) | pH值       | 总固形物/(g·100mL <sup>-1</sup> ) | 总酸/(g·100mL <sup>-1</sup> ) | 还原糖/(g·100mL <sup>-1</sup> ) | 酒精度/%vol |
|----|---------------------------------|------------|-----------|-------------------------------|-----------------------------|------------------------------|----------|
| 1  | Q <sub>2</sub> -J <sub>16</sub> | 64±3       | 3.24±0.01 | 4.70±0.08                     | 0.304±0.010                 | 1.775±0.092                  | 3.5±0.3  |
| 2  | Q <sub>2</sub> -J <sub>26</sub> | 75±2       | 3.28±0.02 | 4.75±0.01                     | 0.318±0.022                 | 1.875±0.064                  | 3.6±0.4  |
| 3  | Q <sub>3</sub> -J <sub>1</sub>  | 77±1       | 3.21±0.01 | 4.80±0.03                     | 0.251±0.040                 | 1.870±0.014                  | 3.3±0.3  |
| 4  | Q <sub>3</sub> -J <sub>2</sub>  | 70±3       | 3.22±0.03 | 4.63±0.18                     | 0.356±0.025                 | 1.810±0.013                  | 3.5±0.1  |
| 5  | Q <sub>3</sub> -J <sub>8</sub>  | 81±2       | 3.19±0.01 | 4.64±0.19                     | 0.307±0.019                 | 1.750±0.071                  | 3.6±0.1  |
| 6  | Q <sub>4</sub> -J <sub>7</sub>  | 61±4       | 3.20±0.02 | 4.81±0.11                     | 0.361±0.063                 | 1.860±0.057                  | 3.0±0.1  |

3.3 黑糯米酒曲中优良酵母菌Q<sub>3</sub>-J<sub>8</sub>的ITS序列分析

3.3.1 黑糯米酒曲中优良酵母菌的ITS序列扩增

以菌株Q<sub>3</sub>-J<sub>8</sub>的基因组为模板,用通用引物ITS5(5'-GG AAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3')和ITS4(5'-TCCTCC GCTTATTGATATGC-3')对筛选所得菌株DNA进行酵母菌PCR扩增得到该酵母菌基因组的ITS序列。由图2可知,优良酵母菌Q<sub>3</sub>-J<sub>8</sub>的ITS序列条带清晰,无明显非特异性条带。

3.3.2 构建黑糯米酒曲中优良酵母菌的系统发育树

用菌株Q<sub>3</sub>-J<sub>8</sub>的ITS序列在NCBI上进行Blast比对,并下载相似度在98%以上的序列,采用MEGA5.05软件,选用邻接法,Bootstrap method 1000,构建系统发育树,结果如图3。

由系统发育树可知,菌株Q<sub>3</sub>-J<sub>8</sub>与FJ433878.1|*Saccharomyces boulardii*的同源性为100%,因此鉴定Q<sub>3</sub>-J<sub>8</sub>为布拉酵母(*Saccharomyces boulardii*)。菌落菌体形态如图4、图5所示。

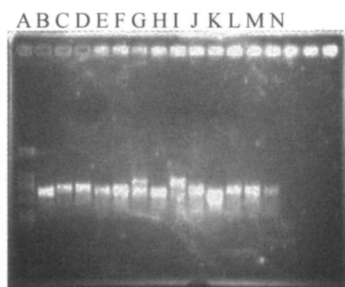


图2 菌株Q<sub>3</sub>-J<sub>8</sub>的PCR电泳图(A:Maker; L: 优良酵母菌Q<sub>3</sub>-J<sub>8</sub>的ITS序列)  
Figure 2. The PCR electrophoresis figure of strain Q<sub>3</sub>-J<sub>8</sub>  
(A:Maker; L: ITS sequences of fine yeasts)

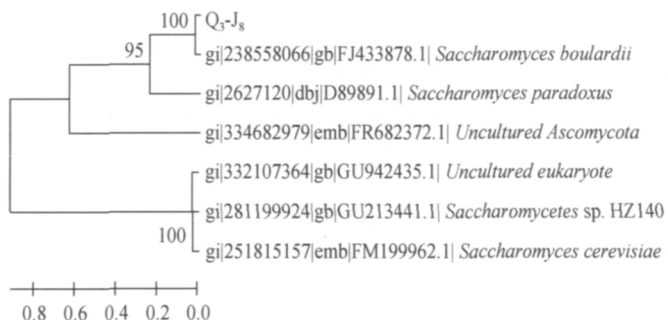


图3 菌株Q<sub>3</sub>-J<sub>8</sub>的系统发育树  
Figure 3. The phylogenetic tree of strain Q<sub>3</sub>-J<sub>8</sub>

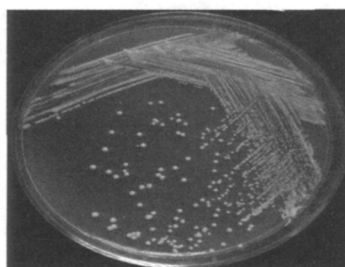


图4 菌株Q<sub>3</sub>-J<sub>8</sub>菌落形态  
Figure 4. Colony morphology of Q<sub>3</sub>-J<sub>8</sub>

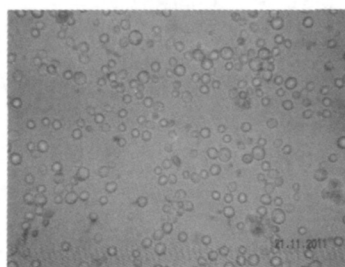


图5 菌株Q<sub>3</sub>-J<sub>8</sub>菌体形态  
Figure 5. Mycelial morphology of Q<sub>3</sub>-J<sub>8</sub>

#### 4 结论

从贵州黑糯米酒曲中分离出酵母菌312株。通过形态学观察及生理生化实验将其鉴定出5个属。酵母属(*Saccharomyces*)57株、假丝酵母属(*Candida*)14株、复膜孢酵母属(*Saccharomycopsis*)28株、毕赤酵母属(*Pichia*)212株、德巴利氏酵母属(*Debaryomyces*)1株。经TTC平板显色发、杜氏管产气法、发酵CO<sub>2</sub>失重法以及玉米糖化酶逐级筛选,最终筛选出一株产酒高产香好的菌株,编号为Q<sub>3</sub>-J<sub>8</sub>。并提取菌株Q<sub>3</sub>-J<sub>8</sub>的ITS序列进行分子学鉴定。最终鉴定布拉酵母(*Saccharomyces boulardii*)。

该菌株对葡萄糖的利用率强、发酵产酒高、产杂醇油低。其发酵产物酸甜适宜、口感醇厚柔和、香气浓郁无异味。是一株可用于发酵酿酒的优良菌株,具有极大的开发利用价值。

#### 参考文献:

- [1] 陈 桐, 陈冷竹. ICP-AES 法测定黑糯米酒中的某些微量元素[J]. 酿酒科技, 2007(11): 104-106.
- [2] 朱 梅. 古今酒事(二十)[J]. 酿酒, 1986, 25(6): 43-45.
- [3] 沈 萍, 范秀容, 李广武. 微生物学实验[M]. 北京: 高等教育出版社, 2004: 69-74.
- [4] KREGER-VAN RIJ NJW. The yeasts a taxonomic study[M]. Amsterdam: Elsevier Science Publisher, 1984.
- [5] J.A.巴尼特, R.W.佩恩, D.亚罗编, 等. 酵母菌的特征与鉴定手册[M]. 青岛: 青岛海洋大学出版社, 1991.
- [6] 中国科学院微生物研究所. 常见与常用真菌[M]. 北京: 科技出版社, 1973.
- [7] 沈 萍, 范秀容, 李广武. 微生物学实验[M]. 北京: 高等教育出版社, 2004: 43-44.
- [8] 王 梅, 张彭湃, 帅桂兰, 等. TTC 在黄酒酵母选育中的应用[J]. 酿酒, 2001(5): 62-64.
- [9] 王昌禄, 吕艳蓓, 武晋海, 等. “神舟”五号飞船搭载茅台酒大曲中酵母菌的分离及特性的初步研究[J]. 天津科技大学学报, 2005, 20(3): 1-4.
- [10] 方心芳. 应用微生物学实验法[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 1993: 63-65.
- [11] D. R.贝里著, 楼纯菊, 徐士菊译. 酵母菌生物学[M]. 上海: 复旦大学出版社, 1987: 16-17.
- [12] 陈思坛, 萧熙佩. 酵母生物化学[M]. 济南: 山东科技出版社, 1990: 266-268.
- [13] 张跃廷, 刘 琼. 浅谈杂醇油[J]. 酿酒, 2002(5): 18-20.
- [14] 陈思坛, 萧熙佩. 酵母生物化学[M]. 济南: 山东科技出版社, 1990: 99-100.
- [15] 郑水根, 周坚勇. 黄酒固形物实验室形态学观察研究[J]. 食品科学, 2001, 22(6): 48-50.

欢迎登录《中国酿造》网站 [www.chinabrewing.net.cn](http://www.chinabrewing.net.cn)

欢迎投稿