

# 羊羔美酒大曲中酵母菌多样性及分子鉴定

李 艳<sup>1,2</sup>, 董振玲<sup>1</sup>, 牟德华<sup>1,\*</sup>

(1.河北科技大学生物科学与工程学院, 河北 石家庄 050018; 2.河北省发酵工程技术研究中心, 河北 石家庄 050018)

**摘 要:**目的: 分离和鉴定羊羔美酒大曲中的酵母菌, 探寻酵母菌群多样性组成, 为深入研究羊羔美酒的风味特征奠定基础。方法: 对羊羔美酒大曲实施多点采样、混合研磨、无菌水梯度稀释、平板划线分离、挑取酵母菌单菌落。酵母菌的形态鉴定采取菌落特征和显微细胞特征结合的方法, 分子鉴定采用5.8S rDNA-ITS区域限制性内切酶片段长度多态性(restriction fragment length polymorphism, RFLP)分析及序列分析法。结果: 从羊羔美酒大曲中共分离出474株酵母菌, 传统形态学鉴定为14种形态类型, 经5.8S rDNA-ITS区域RFLP分析法区分为6种分子类型。经基因序列分析, 将其鉴定为分属于6个属的6种酵母菌, 分别为: 异常毕赤酵母(*Pichia anomala*)、酿酒酵母(*Saccharomyce cerevisia*)、阿氏丝孢酵母(*Trichosporon asahii*)、黏质红酵母(*Rhodotorula mucilaginosa*)、浅白隐球酵母(*Cryptococcus albidus*)、东方伊萨酵母(*Issatchenkia orientalis*)。结论: 羊羔美酒大曲中酵母菌多样性丰富, 除酿酒酵母外, 还含有多种酵母菌辅助代谢产生各种风味物质, 其中酿酒酵母为主要优势菌群。

**关键词:** 羊羔美酒大曲; 酵母菌; 形态分类; 5.8S rDNA-ITS区域RFLP分析

## Diversity and Molecular Biological Identification of Yeast Strains from Yanggaomeijiu Liquor Fermentation Starter (Daqu)

LI Yan<sup>1,2</sup>, DONG Zhen-ling<sup>1</sup>, MOU De-hua<sup>1,\*</sup>

(1. College of Bioscience and Bioengineering, Hebei University of Science and Technology, Shijiazhuang 050018, China; 2. Research & Development Center for Fermentation Engineering of Hebei Province, Shijiazhuang 050018, China)

**Abstract:** Purpose: The aims of this work were to isolate and identify yeast strains from Yanggaomeijiu liquor fermentation starter (Daqu) and to explore the diversity of yeast in Yanggaomeijiu Daqu. Methods: To analyze Yanggaomeijiu Daqu, multipoint sampling, mixing and grinding the samples, a serial dilution with sterile water, streak plating and single colony picking were used in this study. Conventional microbiological analysis and RFLP analysis of the 5.8S-ITS region were conducted to identify the yeast species. Results: A total of 474 yeast isolates were directly obtained from Yanggaomeijiu Daqu, and they can be divided into 14 different groups by conventional microbiological analyses and into 6 genotypes by RFLP analysis of the 5.8S-ITS region. By gene sequencing, 6 different yeast species belonging to 6 genera were detected in the Daqu samples tested, including *Pichia anomala*, *Saccharomyce cerevisia*, *Trichosporon asahii*, *Rhodotorula mucilaginosa*, *Cryptococcus albidus* and *Issatchenkia orientalis*. Conclusions: The yeast diversity in Yanggaomeijiu Daqu was abundant. Besides *Saccharomyce cerevisia*, there were various yeast species contributing to various kinds of flavor substances, and the predominant yeast was *Saccharomyce cerevisia*.

**Key words:** Yanggaomeijiu Daqu; yeast; morphological classification; RFLP analysis of 5.8S rDNA-ITS region

中图分类号: TS261.1

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630(2014)05-0144-06

doi:10.7506/spkx1002-6630-201405029

羊羔美酒选用优质北方黍米、鲜嫩羊肉、新鲜水果及名贵中药材为原料, 经过黍米蒸饭与预先熬制的嫩羊肉汤和果药汁混合, 拌以大麦曲进行糖化和发酵, 经过滤和3年以上陈酿而成, 酒液呈琥珀色, 酒度为17°, 融酯香、奶香、果香、药香于一体, 酸甜适度、风格独特、营养价值很高, 具有滋阴润肺、增补元气、壮腰益

肾、开胃健脾、养肝明目及乌发美容的功效, 是中国独有的高级滋补保健酒。羊羔美酒隶属我国传统黄酒范畴, 但又有若干独特之处, 仅酿酒用曲就体现一大特色, 作为羊羔美酒的生命之源, 探讨酒的风味必先预知酒曲微生物及酶系组成, 而对于酿酒来说, 酵母菌是众多微生物中将糖转化为酒的主要生命体, 因此研究酵母

收稿日期: 2013-08-27

基金项目: 河北省自然科学基金项目(C2011208028); 河北省石家庄市科技支撑计划项目(101171271A; 10117901A)

作者简介: 李艳(1958—), 女, 教授, 本科, 研究方向为饮料酒酿造技术。E-mail: lyndh5885@163.com

\*通信作者: 牟德华(1960—), 男, 教授, 本科, 研究方向为农产品加工。E-mail: dh\_mou@163.com

菌群的组成可为深入研究酒的风味特点奠定良好的基础<sup>[1]</sup>。目前,国内对于酒曲微生物的研究主要集中于白酒酒曲<sup>[2-4]</sup>,而且对酒曲中霉菌的研究较多<sup>[5-6]</sup>,对于黄酒酒曲中酵母菌的研究报道较少,而对这款北方独特的黄酒羊羔美酒酒曲中酵母菌的尚属首例。

本研究以羊羔美酒酿造用酒曲为原料,以酵母菌为研究对象,在培养条件下分离筛选酵母菌,并进行传统的形态分类和分子生物学鉴定,为探明羊羔美酒的奥秘和我国特色黄酒的风味特征研究奠定基础,具有深远的理论和现实意义。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

羊羔美酒大曲由河北味道府酒业有限责任公司提供。

### 1.2 试剂与培养基

配制培养基的各种试剂和生化试剂,包括引物ITS1 (5'-TCC GTA GGT GAA CCT GCG G-3'), ITS4 (5'-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3'), 限制性内切酶 *Hae*III、*Hinf* I、*Hha* I 等均为分析纯,购自生工生物工程(上海)技术服务有限公司。

酵母菌培养用酵母浸出粉胨葡萄糖(yeast extract peptone dextrose, YEPD)培养基<sup>[7-8]</sup>: 葡萄糖20 g/L、蛋白胨20 g/L、酵母浸粉10 g/L、琼脂20 g/L, pH值自然, 121 °C 灭菌20 min。

酵母菌形态鉴定用Wallerstein Laboratory (WL) 培养基: 葡萄糖50 g/L、胰蛋白胨5 g/L、酵母浸粉4 g/L、磷酸二氢钾0.55 g/L、氯化钾0.425 g/L、氯化铁0.25 mg/L、硫酸镁0.125 g/L、氯化钙0.125 g/L、硫酸锰0.25 mg/L、溴甲酚绿22 mg/L、琼脂20 g/L, pH 5.5。

### 1.3 仪器与设备

PCR仪、凝胶成像分析仪 美国Bio-Rad公司; 琼脂糖水平板电泳仪 北京六一公司。

### 1.4 方法

#### 1.4.1 酒曲中酵母菌的分离

干酒曲中酵母菌的分离: 从羊羔美酒用大曲饼的外表面、中间和内部分别取样, 混合研磨成粉, 取1 g加入100 mL无菌水, 置于摇床上150 r/min、30 min, 静止, 取其上清液进行一系列10倍梯度稀释<sup>[9]</sup>, 选择适宜的稀释梯度, 取0.2 mL稀释液于YEPD培养基进行28 °C涂布培养, 2 d后从平板上挑取酵母菌, 再划线接种于相同培养基得单菌落。

培养状态下酵母菌的分离: 分别以大米、糯米为酒曲活化基质进行微生物的富集培养, 同时以黍米的羊羔美酒发酵过程为对照, 在接种后第0、1、2、4、6、8、10、14、18、25天分别取样进行酵母菌分离纯化, 培养

温度为30 °C和25 °C。取样基质1 g, 加100 mL无菌水打浆, 取5 mL浆液进行系列10倍梯度稀释, 选3个合适的稀释度0.2 mL进行3个平行平板的涂布分离培养。28 °C培养2 d, 进行菌落计数并挑取酵母菌, 再划线接种于相同培养基得单菌落。

#### 1.4.2 酵母菌的形态聚类

将获得的酵母菌用YEPD培养基进行活化复筛, 划线接种于WL培养基, 28 °C培养5 d, 观察酵母菌在WL培养基上菌落的颜色、形态、表面是否光滑、边缘是否整齐等菌落特征。同时, 在显微镜下观察酵母的细胞形态。以此对分离到的酵母菌株进行初步的形态聚类<sup>[10-11]</sup>, 并进行保藏。

#### 1.4.3 酵母菌的分子鉴定

酵母菌的分子鉴定的方法采用5.8S rDNA-ITS区域限制性内切酶片段长度多态性(restriction fragment length polymorphism, RFLP)分析法。经初步形态聚类的酵母菌分别取一株代表菌株, 用十二烷基硫酸钠(sodium dodecylsulfate, SDS)热裂解法<sup>[12]</sup>提取基因组DNA, 用引物ITS1和ITS4对菌株的5.8S rDNA-ITS区进行基因扩增<sup>[13-14]</sup>。PCR反应混合液包括: 双蒸水33.65 μL, Buffer 10 μL, dNTP 1 μL, 正向引物2 μL, 反向引物2 μL, DNA模板1 μL, *Taq*酶0.35 μL, 反应总体积为50 μL。PCR反应条件为: 94 °C预变性3 min, 变性35 s, 55 °C退火35 s, 72 °C延伸35 s, 共35个循环, 最后72 °C延伸3 min。将得到的PCR产物经1%琼脂糖凝胶电泳。溴化乙锭染色10 min, 凝胶成像分析仪下观察并摄影。

5.8S-ITS区域基因扩增产物限制性酶切分析(20 μL): 双蒸水9 μL, Buffer 2 μL, PCR产物8 μL, 内切酶(*Hae*III、*Hinf* I、*Hae*III) 1 μL。酶切条件: 37 °C水浴2.5 h。取出置于4 °C冰箱保存。酶切产物用2%琼脂糖凝胶进行电泳, 酶切产物加样量8 μL与1 μL的10×Loading buffer混匀后加样, 加入5 μL的Marker为对照, 电泳电压为70~80 V, 时间60~70 min, 溴化乙锭染色10 min, 凝胶成像分析仪下观察并摄影。

将酵母菌株5.8S rDNA ITS区PCR产物送至生工生物工程(上海)技术服务有限公司, 委托其进行基因序列测定。测序结果在NCBI数据库中进行BLAST比对, 进行同源性分析。下载相关菌株序列信息, 使用MEGA4软件中的邻接法(Neighbor-Joining)构建系统树图, 并以Bootstrap对进化树进行1 000次可信度分析。

#### 1.4.4 羊羔美酒发酵过程中酵母菌群动态微生态结构研究

根据酵母菌的形态菌类结果与分子鉴定结果, 对羊羔美酒发酵过程中分离到的不同种类的酵母菌种类与数量进行统计分析, 分析发酵过程各类酵母所占比例和变化规律<sup>[9]</sup>。

2 结果与分析

2.1 酵母菌的形态聚类

经分离纯化共得到474株酵母菌，其中非培养状态下得到17株，大米和糯米为培养基质，不同培养温度条件下得到152株，在羊羔美酒发酵生产过程中分离得到305株。依据在WL培养基上长出的酵母菌菌落形态和颜色特征，结合显微镜下观察酵母菌的细胞形态，可将其区分为14种形态类型，结果见表1。

不同种类的酵母菌在WL营养培养基上生长的菌落颜色和形态不同，因此可作为酵母菌鉴别性培养基。在羊羔美酒大曲中分离得到的酵母菌绝大多数可以用WL培养基进行区分，再结合不同酵母菌的细胞显微形态不同，可以将酵母菌进行初步形态聚类分析。从表1可以看出，成品干曲中仅可分离到1种类型的酵母菌。而在利用大米和糯米为培养基质，25℃和30℃培养条件下可分离到8种形态类型的酵母菌。在以黍米为原料的羊羔美酒发酵过程中，分离得到了13种形态类型的酵母菌。其中，形态2是成品曲中分离到的唯一酵母菌，它同时出现在各种分离条件下和实际生产过程中，根据其形态学特征，可以初步判定为酿酒酵母，其数量也占分离酵母菌的最大比重，为典型的优势菌群，显微镜下其细胞形态如图1。

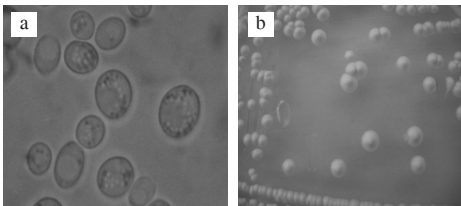
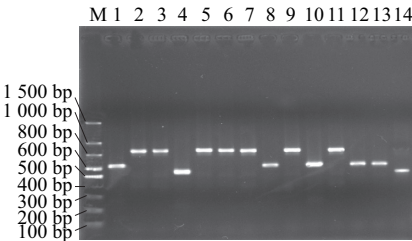


图1 优势酵母菌的细胞(a)和菌落(b)形态(×40)

Fig.1 Cellular (a) and colony (b) morphology of the predominant yeast species (×40)

2.2 酵母菌株5.8S rDNA- ITS区RFLP分析



M. 100 bp DNA Marker; 1~14. 14种酵母菌形态类型编号。下同。

图2 5.8S rDNA-ITS区域PCR产物电泳图谱

Fig.2 PCR electrophoretogram of 5.8S rDNA-ITS region

目前，鉴定酵母菌常用的分子手段是酵母菌的5.8S rDNA-ITS区RFLP分析，其原理是酵母菌5.8S rDNA及两侧的内转录间隔区(ITS区)既有高度保守性又具有明显的种间差异性，因此可以作为区分鉴定酵母菌的分类依据<sup>[15-18]</sup>。本研究在WL培养基进行酵母菌形态聚类分析的基础上，从每种形态类型中随机选择1株酵母菌进行核糖体5.8S-ITS区基因扩增，14种形态酵母菌的5.8S-ITS区rRNA基因扩增产物电泳图见图2。同时使用HaeIII、Hinf I和Hha I酶对PCR扩增产物进行酶切分析，酶切电泳图谱见图3。

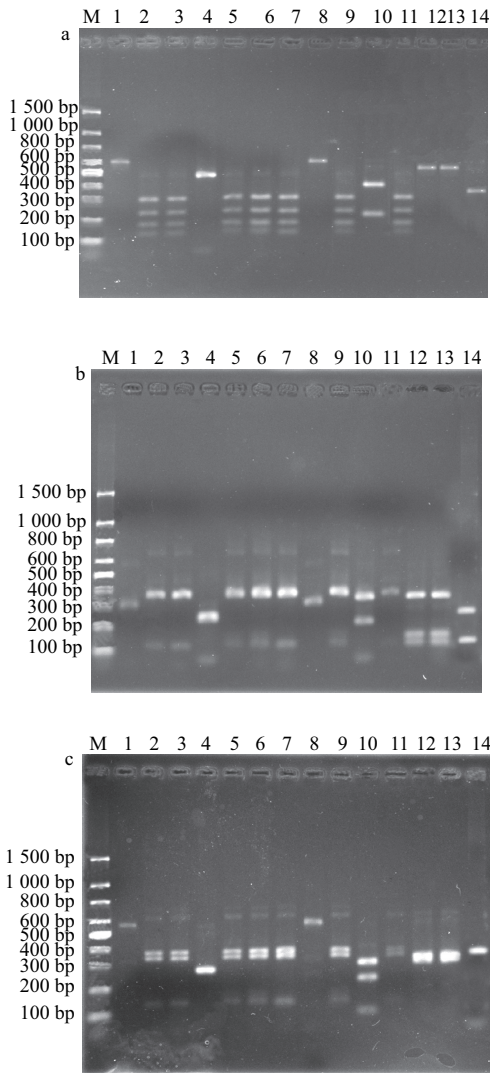
表1 WL培养基上酵母菌的形态特征及数量

Table 1 Morphological characteristics and number of the yeasts on WL medium

形态类型	菌落形态描述	分离时期(菌株数)		
		成品曲	大米(25℃、30℃)、糯米(30℃)培养	发酵生产过程中
1	中心蓝色，边缘青绿色，平铺于培养基上，稍有突起，无褶皱，较湿润			FJ1-10 (1)
2	中心草绿色，边缘极浅绿色，山状突起，无褶皱，较湿润	17	D30-2, 4, 6, 8, 10, 14 (34); D25-4, 6, 8, 10, 14 (34); N30-4, 6, 8 (26)	FJ1-3, 5, 7, 10, 15, 25 (103); FJ2-0, 1, 3, 3, 5, 7, 10, 18 (121)
3	中心绿色，边缘浅绿，山状突起，无褶皱，较湿润，奶油状，光滑			FJ1-5, 7, 10, 15 (8); FJ2-2, 3, 5, 7, 10, 15 (23)
4	中心周围蓝色，边缘绿色，中心点白色，中心点呈点状突起，绒毛状较干燥		D30-10 (4); D25-10 (1); N30-0, 1, 2 (15)	FJ1-25 (1); FJ2-5, 7, 15, 18 (9)
5	浅荧光绿色，球状突起，无褶皱，湿润		D30-8, 14 (3)	FJ1-25 (1); FJ2-0 (1)
6	较深荧光绿色，中心有点状绿色，球状突起，无褶皱，较湿润		D30-8 (1)	FJ1-3, 15 (2); FJ2-2, 15 (3)
7	草绿色菌体，中心球状突起，中点颜色较深，无褶皱，较干燥，不光滑		D30-8 (3)	FJ2-2, 3, 18 (4)
8	浅湖绿色，边缘颜色浅，扁平中心稍有突起，菌落适中，光滑较湿润，无褶皱		D30-2, 4, 6, 8, 10 (10); D25-1, 6 (2); N30-1, 2 (3)	FJ2-3, 10 (2)
9	颜色一致，青绿色，山状突起，无褶皱，光滑较干燥			FJ2-5 (1)
10	砖红色，颜色一致，光滑，较湿润，球状突起			FJ1-5, 10, 25 (5); FJ2-0, 1, 2, 3, 5, 7 (17)
11	白色略带蓝绿色，半球状突起，湿润无绒毛，光滑			FJ1-5 (1)
12	草绿色菌体，较干燥，蜡状，边缘浅绿色，青绿色，光滑，平铺			FJ2-5 (1)
13	较浅草绿色，干燥，蜡状，光滑，边缘颜色浅，平铺		D30-1, 4 (2); D25-2, 14 (2); N30-2, 4 (11)	FJ2-7 (1)
14	奶油黄色，较干燥，中心突起，无褶皱，有绒毛		N30-0 (1)	

注：D30-2, 4, 6, 8, 10, 14 (34) 表示大米基质，30℃培养至第2、4、6、8、10、14天时分离得到的酵母菌，括弧内的数字表示分离的菌株数量为34株；D25 大米基质，25℃培养；N30 糯米基质，30℃培养；FJ1-3, 5, 7, 10, 15, 25 (103)。第一批发酵(黍米基质)至第3、5、7、10、15、25天时分离的酵母菌，括弧内的数字表示分离的菌株数量为103株；FJ2. 第二批发酵过程中分离的酵母菌(发酵基质、分离时间等条件同第一批)。





a. *Hae*III酶切图谱; b. *Hinf*I酶切图谱; c. *Hha*I酶切图谱。

图3 PCR产物的3种限制性内切酶酶切分析图谱

Fig.3 Restriction analysis patterns of the PCR-amplified 5.8S-ITS region

14种酵母菌的PCR产物大小均在500~800 bp, 经过*Hae*III、*Hinf*I和*Hha*I酶进行酶切后, 可以将其区分为6种分子类型。I类: 包括形态1和8, PCR产物大小为626 bp, 经*Hae*III、*Hinf*I和*Hha*I酶切后, 均产生1个酶切片段, 分别为600、281、567 bp。II类: 包括形态2、3、5、6、7、9和11, PCR产物大小为850 bp, 经*Hae*III酶切后, 有4个酶切片段, 即310、230、179 bp和125 bp; 经*Hinf*I酶切后, 有2个酶切片段, 345 bp和120 bp; 由*Hha*I酶进行酶切后, 有2个主要酶切片段, 364 bp和335 bp。III类: 形态4, PCR产物大小为536 bp, 经*Hae*III、*Hinf*I和*Hha*I酶切后, 均产生1个酶切片段, 分别为481、224、268 bp。IV类型: 形态10, PCR产物大小为616 bp, 经*Hae*III酶切后, 有2个酶切片段, 406 bp和221 bp; 经*Hinf*I酶切后, 有2个酶切片段, 353 bp

和225 bp; 由*Hha*I酶进行酶切后, 有2个酶切片段, 292 bp和223 bp。V类型: 形态12和13, PCR产物大小为621 bp, 经*Hae*III酶切后, 有1个酶切片段, 504 bp; 经*Hinf*I酶切后, 有3个酶切片段, 335、144 bp和117 bp; 由*Hha*I酶进行酶切后, 有1个酶切片段, 309 bp。VI类型: 形态14, PCR产物大小为514 bp, 经*Hae*III酶切后, 有1个酶切片段, 336 bp; 经*Hinf*I酶切后, 有2个酶切片段, 217 bp和133 bp; 由*Hha*I酶进行酶切后, 有1个酶切片段, 348 bp。结合5.8S rDNA-ITS区基因PCR扩增结果及其限制性内切酶*Hae*III、*Hinf*I和*Hha*I酶切片段的RFLP分析, 可将14种酵母菌区分为6类, 见表2。

表2 酵母菌5.8S rDNA-ITS区域RFLP分析

分子类型	形态类型	5.8S rDNA PCR分子质量/bp	<i>Hae</i> III酶切结果/bp	<i>Hinf</i> I酶切结果/bp	<i>Hha</i> I酶切结果/bp
I	1、8	626	600	281	567
II	2、3、5、6、7、9、11	850	310+230+179+125	345+120	364+335
III	4	536	481	224	268
IV	10	616	406+221	353+225	292+223
V	12、13	621	504	335+144+117	309
VI	14	514	336	217+133	348

### 2.3 酵母菌株5.8S-ITS区基因序列分析

本研究将酵母菌的5.8S rDNA-ITS区域RFLP分析结果与本研究室已经过测序的酵母菌进行了比对, 发现分子类型II, 包括形态类型2、3、5、6、7、9、11酵母菌的5.8S rDNA-ITS区 RFLP分析结果与自选酿酒酵母(编号KDLYC19-255, GenBank登录号: HQ909096)完全一致, 因此可确定其为酿酒酵母<sup>[19]</sup>。其余5种分子类型的酵母菌随机选择1株进行基因测序, 将所得基因序列结果登录GenBank数据库, 进行BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi>)相似性比对, 以相似度大于99%确定其属种, 测序结果见表3。

表3 酵母菌5.8S rDNA-ITS区序列分析结果

形态类型	菌株编号	酵母菌属、种	相似度/%	GenBank登录号
1、8	KDLYL8-1	<i>Pichia anomala</i>	99	JX174410
4	KDLYL4-1	<i>Trichosporon asahii</i>	100	JX174411
10	KDLYL10-1	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	99	JX174412
12、13	KDLYL12-1	<i>Cryptococcus albidus</i>	100	JX174413
14	KDLYL17-1	<i>Issatchenkia orientalis</i>	100	JX174414

结合表2、3可以看出, 经过形态学区分和分子生物学鉴定, 可以将14种形态的酵母菌区分成6种5.8S rDNA-ITS区RFLP类型, 归属到6个属中的6种酵母菌, 分别为异常毕赤酵母(*Pichia anomala*)、酿酒酵母(*Saccharomyce cerevisia*)、阿氏丝孢酵母(*Trichosporon asahii*)、黏质红酵母(*Rhodotorula mucilaginosa*)、浅白隐球酵母(*Cryptococcus albidus*)和东方伊萨酵母(*Issatchenkia orientalis*)。

通过Neighbor-Joining法构建的系统发育树可以判断酵母菌的同源关系,如图4所示。在系统发育树上同一分支的酵母同源关系最近,从聚类结果可以清楚的看出所分离酵母菌的分类情况及各自的种属名称。

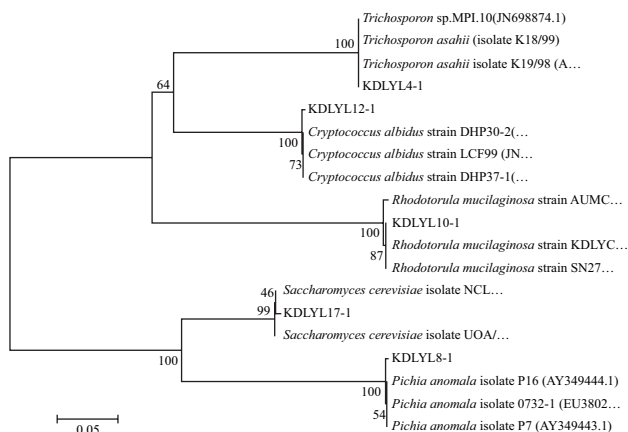


图4 基于5.8S rDNA-ITS区序列和Neighbor-Joining法构建的系统发育树

Fig.4 Phylogenetic tree based on 5.8S-ITS region sequences by neighbor-joining method

## 2.4 羊羔美酒发酵过程中酵母菌群动态微生态结构

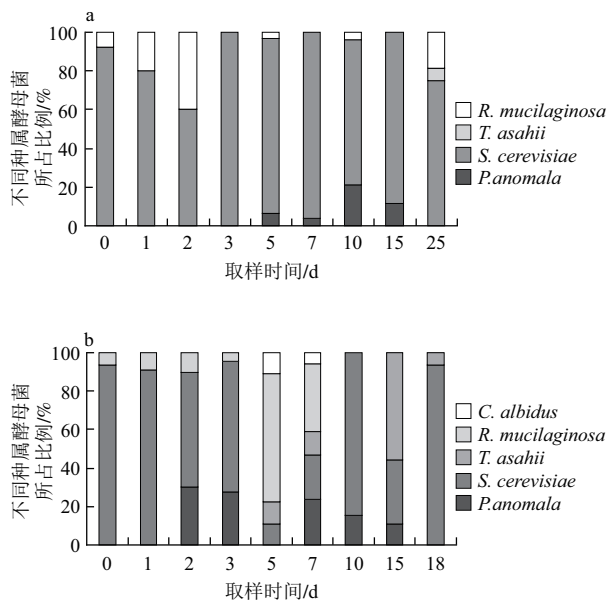


图5 羊羔美酒发酵过程中第一批(a)和第二批(b)酵母菌的菌群动态变化

Fig.5 Yeast population dynamics during Yanggaoemeijiu fermentation

羊羔美酒发酵过程中存在的酵母菌包括产酒精酵母和产酯酵母,酒精酵母利用可发酵糖转化为乙醇,产酯酵母可产酯或产酸,与酒体香气、口感密切相关。这些酵母菌从酒曲或发酵环境中进入发酵醪液,在发酵前期利用可发酵糖生长繁殖,随着发酵的进行,酒精含量逐渐升高,低发酵能力和酒精耐受力较差的微生物菌株逐

渐被抑制或消亡,到发酵中后期,发酵能力强、耐酒精能力好的酵母成为优势菌群。羊羔美酒发酵过程中酵母菌的菌群动态变化见图5。从整体来看,两批发酵过程中大体趋势相同,都是以酿酒酵母为主要优势菌,其他类型的酵母菌在发酵过程中出现的种类和比例略有不同。分析可能是由于酒曲的批次不同,导致在后续发酵过程中菌群出现了波动。毕竟酒曲的制备过程是在一个开放的环境中,网罗自然环境的微生物群落,环境的微改变可能会影响酒曲最终微生物比例的波动。羊羔美酒的发酵也是传统的开放式发酵环境,使用的器具、设备及周围的环境中存在的微生物均对研究结果产生影响。

羊羔美酒发酵前期第0~5天,存在的酵母菌有*Saccharomyces cerevisiae*、*Pichia anomala*和*Rhodotorula mucilaginosa*,前2d的主要菌群为*Saccharomyces cerevisiae*。第3~5天,第一批主导酵母菌群是*Saccharomyces cerevisiae*酿酒酵母菌,第二批优势酵母菌群为*Saccharomyces cerevisiae*和*Pichia anomala*。发酵5d以后至15d时,第二批发酵醪液中的酵母菌群明显丰富,有*Saccharomyces cerevisiae*、*Trichosporon asahii*、*Pichia anomala*和*Cryptococcus albidus*等,在第7天大量出现*Pichia anomala*和*Rhodotorula mucilaginosa*酵母菌,而在第10天时*Saccharomyces cerevisiae*酵母菌占主导优势,此后的15d最多的酵母菌为*Trichosporon asahii*和*Saccharomyces cerevisiae*,而第一批发酵在该阶段的优势菌群依然是酵母菌*Saccharomyces cerevisiae*,发酵后期,即发酵15d以后,羊羔美酒发酵醪液中的优势菌群为*Saccharomyces cerevisiae*酵母菌。

酿酒酵母是成品酒曲的主体酵母菌,采用大米和糯米为基质培养酒曲分离到的酵母菌中酿酒酵母仍为主体菌株,在羊羔美酒实际生产过程中依然是酿酒酵母为主发酵菌,它将糖转化为乙醇,符合黄酒发酵的一般规律<sup>[20]</sup>。分子类型III即形态类型4的丝孢酵母,有分解脂肪的能力,且耐酒精度有时可达17%以上,因此在发酵后期酒精浓度很高的条件下仍可以分离到该酵母菌<sup>[21]</sup>。分子类型VI即形态类型14为东方伊萨酵母,刘婷婷<sup>[22]</sup>在酒曲或出池酒醅中曾分离到此菌株,其结果表明东方伊萨酵母在42℃条件下仍有较好的生长。在本实验麦曲制作过程中有55~60℃的高温阶段<sup>[23]</sup>,另外可能由于其对发酵环境的变化耐受力弱,因此本研究中分离到该菌的数量很少。形态类型1、10、12分别为*Pichia anomala*(异常毕赤酵母)、*Rhodotorula mucilaginosa*(黏质红酵母)、*Cryptococcus albidus*(浅白隐球酵母),曹钰等<sup>[24]</sup>的研究结果中也有发现,但其具体性能还未见报道,需要进一步研究。

### 3 结 论

本实验研究了对羊羔美酒用大曲中酵母菌的多样性和优势酵母菌群。共分离到酵母菌474株,形态聚类 and 分子鉴定的结果显示羊羔美酒大曲中酵母菌的多样性。通过基因序列分析最终鉴定出分属于6个属的6种酵母菌。酿酒酵母为主要优势菌群。本实验将传统酵母菌的形态学分析与现在分子技术相结合,通过基因序列分析使菌种鉴定的结果准确性和可靠性提高。研究结果可以反映羊羔美酒大曲中酵母菌的多样性,为进一步研究具有我国北方特色的地方性名酒风味物质特征、改进传统的配料和酿造工艺提供参考。

### 参考文献:

- [1] 万自然. 大曲培养过程中微生物及酶的变化[J]. 酿酒科技, 2004(4): 25-26.
- [2] 刘婷婷, 张明春, 曾驰, 等. 白云边酒大曲及小麦原料中主要微生物的分析[J]. 中国酿造, 2010, 29(11): 32-34.
- [3] 李健容, 蔡爱群. 民间传统酒曲主要微生物的分离及鉴定[J]. 酿酒科技, 2007(5): 111-121.
- [4] 张明春, 曹敬华, 向苇, 等. 白云边酿酒大曲微生物分析研究[J]. 酿酒科技, 2010(2): 65-67.
- [5] 赵文婧, 张杨, 孙慧静. 山西后沟堡子酒大曲中优势霉菌的分离及鉴定[J]. 广东农业科学, 2011(18): 69-71.
- [6] 武晋海, 于亮, 王昌禄, 等. 茅台酒大曲中3株耐高温霉菌的分离纯化及鉴定[J]. 酿酒科技, 2007(3): 17-19.
- [7] 王凤梅, 马利兵, 刘树文. 内蒙古土默川平原葡萄酒相关酵母多样性研究[J]. 食品与生物技术学报, 2009, 28(3): 385-389.
- [8] 李艳, 卢君, 张利中, 等. 沙城龙眼葡萄自然发酵过程相关酵母生物多样性研究[J]. 食品科学, 2009, 30(21): 237-240.
- [9] 杨美景, 陈小波, 赵静静, 等. 赤霞珠葡萄自然发酵过程中酵母菌的分离与鉴定[J]. 食品与发酵工业, 2011, 37(7): 22-27.
- [10] 杨雪峰, 苏龙, 刘树文. 利用WL培养基鉴定葡萄酒中的相关酵母菌[J]. 中外葡萄与葡萄酒, 2006(4): 4-7.
- [11] 薛军侠, 徐艳文, 杨莹, 等. WL培养基在酿酒酵母筛选中的应用[J]. 中国酿造, 2007, 26(9): 36-39.
- [12] 卢君. 沙城产区龙眼葡萄相关酵母菌生物多样性研究及优良酵母菌种的筛选[D]. 石家庄: 河北科技大学, 2010.
- [13] CHAVAN P, MANE S, KULKARNI G, et al. Natural yeast flora of different varieties of grapes used for wine making in India[J]. Food Microbiology, 2009, 26: 801-808.
- [14] BAUTISTA-GALLEGO J, RODRÍGUEZ-GÓMEZ F, BARRIO E, et al. Exploring the yeast biodiversity of green table olive industrial fermentations for technological applications[J]. International Journal of Food Microbiology, 2011, 147(2): 89-96.
- [15] 卢君, 李艳. 分子生物学技术在葡萄酒相关酵母菌分类鉴定中的应用及研究进展[J]. 酿酒科技, 2009(6): 92-98.
- [16] JAMES S A, COLLINS M D, ROBERTS I N. Use of an rRNA internal transcribed spacer region to distinguish phylo-genetically closely related species of the genera *Zygosaccharomyces* and *Torulaspora*[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 1996, 46(1): 189-194.
- [17] SANTO D E, GALEGO L, GONÇALVES T, et al. Yeast diversity in the Mediterranean strawberry tree (*Arbutus unedo* L.) fruits' fermentations[J]. Food Research International, 2012, 47(1): 45-50.
- [18] ESTEVE-ZARZOSO B, BELLOCH C, URUBURU F, et al. Identification of yeasts by RFLP analysis of the 5.8S rRNA gene and the two ribosomal internal transcribed spacers[J]. International Journal of Systematic Bacteriology, 1999, 49: 329-337.
- [19] 杨美景. 河北省昌黎酿酒葡萄产区相关酵母菌分布规律研究[D]. 石家庄: 河北科技大学, 2011.
- [20] 熊子书. 中国酿酒酵母菌的研究: 不同酒类酵母筛选与应用纪实[J]. 酿酒科技, 2002(4): 19-21.
- [21] 毛青钟, 刘瑾. 黄酒酒药微生物和在酿造中的作用[J]. 食品工业科技, 2004(5): 138-140.
- [22] 刘婷婷. 白云边酒酿造微生物分析及东方伊萨酵母发酵特性研究[D]. 武汉: 武汉工业学院, 2011.
- [23] 汪建国. 传统麦曲在黄酒酿造中的作用和特色[J]. 中国酿造, 2004, 23(10): 29-31.
- [24] 曹钰, 陈建尧, 谢广发, 等. 黄酒麦曲天然发酵中真菌群落的成因初探[J]. 食品与生物技术学报, 2008, 27(5): 95-100.