

文章编号: 1000-5862(2018)01-0106-05

# 曲霉型豆豉中高产酒精酵母菌的定向筛选及分子鉴定

万 明<sup>1</sup>, 廖焰焰<sup>2</sup>, 王筱兰<sup>2\*</sup>

(1. 南昌工学院基础教学部, 江西 南昌 330108; 2. 江西师范大学生命科学院,  
江西省亚热带植物资源保护与利用重点实验室, 江西 南昌 330022)

**摘要:** 从传统曲霉型豆豉发酵阶段的微生物用 TTC 培养基进行分离、初筛和复筛, 获得 1 株高产酒精的菌株, 用重铬酸钾法测定该菌株产乙醇的能力为  $2.14 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ . 将该菌株进行形态学鉴定及将所获得的 ITS 序列输入 NCBI 中进行 Blast 比对和构建系统进化树等分子鉴定, 发现该菌株与酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*) 的相似度高达 100%, 联合形态学鉴定和分子生物学鉴定, 鉴定该菌株为酿酒酵母. 研究结果为制作风味良好的豆豉提供基础, 同时也为豆豉工业化生产提供良好的菌源.

**关键词:** 豆豉; 产酒精菌株; 筛选; 鉴定; 酿酒酵母

**中图分类号:** Q 946.5 **文献标志码:** A **DOI:** 10.16357/j.cnki.issn1000-5862.2018.01.18

## 0 引言

豆豉是以大豆为主要原料, 经过浸泡蒸煮, 利用微生物发酵制成的具有独特风味的传统发酵豆制品<sup>[1]</sup>. 我国科研工作者已经对豆豉发酵进行了大量的研究<sup>[2-4]</sup>, 豆豉发酵过程中产生的中间产物, 如肽、多肽、氨基酸等, 对消化力减退和患有功能障碍的病人十分有利<sup>[5]</sup>. 纳豆被认为是日本人长寿的秘方<sup>[6-7]</sup>, 纳豆中含有直接或间接溶解血栓的纳豆激酶, 其中弹性蛋白酶和植酸酶已应用于食品工业. 经常食用纳豆可增加血浆中溶纤活性, 可预防和治疗心脑血管疾病<sup>[8-10]</sup>.

传统豆豉是以家庭作坊式为主, 制曲采用自然开放式, 无法对豆豉发酵质量进行掌控. 此外, 自然发酵有可能因为腐败菌和病原菌带来卫生和安全的隐患<sup>[2, 11-12]</sup>. 为控制发酵质量, 需选取优势菌株进行纯种发酵, 实现工业化的生产. 李祥<sup>[13]</sup>在细菌型豆豉生产研究中发现参与细菌型豆豉发酵的微生物主要有豆豉芽孢杆菌、枯草芽孢杆菌、乳酸菌和微球菌. 酵母菌在豆豉的后发酵过程中起着至关重要的作用, 酵母菌无氧发酵分解大分子物质的同时产生乙醇, 乙醇能与酸类物质反应产生酯, 对豆豉风味的形成有很大作用<sup>[14-15]</sup>.

本文从传统曲霉型豆豉发酵阶段通过分离、初

筛和复筛, 获得 1 株高产酒精的菌株, 用重铬酸钾法测定该菌株产乙醇的能力为  $2.14 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ . 通过形态学鉴定及分子鉴定该菌株为酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*). 获得的高产酒精菌株酿酒酵母将为制作风味良好的豆豉提供基础, 同时也为豆豉工业化生产提供了良好的菌源.

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与设备

1.1.1 实验原料 从南昌稻香园调味食品有限公司采集的豆豉样品, 用自封袋封装置于  $4^\circ\text{C}$  冰箱中冷藏, 用发酵第 12 天的样品进行研究.

1.1.2 实验仪器 烧杯、三角瓶、玻璃棒、试剂瓶、显微镜、pH 值试纸、酒精灯、移液枪、胶头滴管、磁力搅拌器、无菌室、电子称、隔水式恒温培养箱、鼓风干燥箱、微波炉、比色皿、分光光度计、涂布棒、接种环、高压灭菌锅.

1.1.3 培养基 麦芽汁培养基: 氯霉素  $0.01\%$ , 麦芽膏浸粉  $13\%$ , 琼脂  $1.5\%$ , pH 值为 6.4. TTC 上层培养基: TTC (红四氮唑)  $0.05\%$ , Glu 葡萄糖  $0.5\%$ , 琼脂  $2\%$ . TTC 下层培养基: Glu  $2\%$ , 酵母粉  $0.5\%$ , 蛋白胨  $1\%$ , 琼脂粉  $2\%$ , pH 值为 7.0. YPD 培养基: 胰蛋白胨  $2\%$ , 葡萄糖  $2\%$ , 琼脂  $2\%$ . 灭菌

收稿日期: 2017-09-14

基金项目: 国家自然科学基金(31760449)资助项目.

通信作者: 王筱兰(1965-), 女, 江西景德镇人, 教授, 博士, 主要从事发酵微生物应用研究. E-mail: xlwang08@aliyun.com

条件: 115 ℃ 30 min.

1.2 实验方法

1.2.1 样品处理 取发酵 8 d 的豆豉 5 g 加入 50 mL 生理盐水, 在振荡器下浸泡 30 min.

1.2.2 富集培养 取处理菌液 1 mL, 于麦芽汁培养基中 30 ℃ 静置培养 48 h.

1.2.3 分离纯化 将富集培养后的原液进行  $10^{-1} \sim 10^{-8}$  不同梯度的稀释, 取  $10^{-3} \sim 10^{-8}$  的稀释液涂布在麦芽汁培养基中培养 48 h. 用竹签将产生的形态不同的单菌落挑出来, 分别保存到斜面.

1.2.4 初筛 将斜面上的单菌落用接种针点到 TTC 下层培养基上 48 h, 再将 TTC 上层培养基倒入平板中, 待其冷却 2 h 后观察 TTC 上层培养基的变色情况, 将能够使 TTC 上层培养基变色的单菌落的斜面保存起来.

1.2.5 复筛 将初筛获得的斜面用接种针点到 TTC 下层培养基中 30 ℃ 培养 48 h, 然后用 TTC 显色法比对单菌落的颜色, 选择颜色较深的菌株进行发酵培养.

1.2.6 发酵培养 将复筛得到的菌株接种到 YPD 发酵培养基中进行厌氧发酵, 于 30 ℃ 培养箱中静置培养 72 h. 将所获得的发酵液离心获得上清液, 离心条件是  $10\,000\text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ .

1.2.7 标准曲线的制作 准确吸取 5 mL 无水乙醇, 加入到 100 mL 容量瓶中, 定容成体积分数为 5.0% 的乙醇标准液. 然后吸取上述标准液 0.0, 1.0 2.0 3.0 4.0 5.0 6.0 7.0 mL 于 50 mL 容量瓶中, 此标准系列相当于含有酒精体积分数为 0.0% , 0.10% , 0.20% , 0.30% , 0.40% , 0.50% , 0.60% 和 0.70% 的酒精, 取上述标准液 5 mL 加入到锥形瓶中, 然后依次加入 10 mL 2.0% 的重铬酸钾溶液和 5.0 mL 98% 的浓硫酸, 摇匀, 用一层锡箔纸轻封口, 反应 10 min 后, 摇匀, 冷却至室温, 以空白标准液作对比, 在 610 nm 波长下测定各浓度的吸光度. 用吸光度对酒精浓度作图, 绘标准曲线.

1.2.8 发酵液中乙醇的含量测定 将 5.0 mL 发酵上清液加到 100 mL 容量瓶中定容. 取 5 mL 加入到锥形瓶中, 并加 2% 的重铬酸钾溶液 10 mL 和 98% 的浓硫酸 5.0 mL, 摇匀, 用一层锡箔纸轻封口, 反应 10 min 后, 摇匀, 冷却至室温. 设空白标准液作对比, 在 610 nm 波长下测定其吸光度, 根据标准曲线测定酒精度.

1.3 形态学观察

将经过初筛和复筛的菌株进行染色, 在显微镜下观察菌株的形态, 并进行生理生化鉴定. 待测菌株用革兰氏染色, 观察其形态.

1.4 分子生物学鉴定

1.4.1 总 DNA 提取 按照 OMEGA 公司的 Yeast 基因组 DNA 提取试剂盒说明书提取, 具体提取步骤参照试剂盒的说明书.

1.4.2 PCR 扩增 依据 ITS 序列的通用引物 ITS 1 和 ITS 4, ITS 1 引物序列为 “CTTGGTCATTTA GACGAAGTAA”, ITS 4 引物序列为 “GCATAT-CAATAAGCGGAGGA”. PCR 反应体系 40  $\mu\text{L}$ , 该体系见表 1, 采用 TAKARA 公司的 EX-taq 酶进行 PCR 扩增. 热循环参数 95 ℃ 预变性 2 min, 95 ℃ 变性 30 s, 55 ℃ 退火 30 s, 72 ℃ 延伸 1 min, 循环 29 次, 72 ℃ 延伸 5 min, 最后 16 ℃ 1 min. 反应结束后取 5  $\mu\text{L}$  PCR 产物在 0.8% 琼脂糖凝胶上进行电泳, 然后再将产物送至上海生工进行测序.

表 1 PCR 反应体系

组分	体积/ $\mu\text{L}$
Premix rTaq	20
引物 1	2
引物 2	2
模板	1
dd H <sub>2</sub> O	15

1.4.3 系统进化树的构建 将序列同 GenBank 数据库中的几个菌株的 ITS 核苷酸序列进行比较, 采用 MEGA6.06 软件对菌株的测序结果进行了系统发育分析, 采用 Neighbor-joining 方法构建系统发育树, 并进行 Bootstrap 分析, 重复次数为 1 000 次.

2 结果与分析

2.1 分离纯化

通过菌株分离纯化, 共得到 50 株单菌落, 将所得单菌落用于下一步初筛.

2.2 初筛

将分离纯化的单菌落点到 TTC 下层培养基中培养 48 h, 再倒入 TTC 上层培养基 2 h 后产生红色的单菌落, 由于 TTC 上层培养基中含有红四氮唑 (TTC), 它能够与乙醇发生显色反应变红, 乙醇浓度越高, 则颜色越深<sup>[16]</sup>. 挑选 26 株能够产生红色的单菌落, 将这些单菌落所对应的斜面用于复筛.

2.3 复筛

将初筛所得的能够使 TTC 上层培养基变红的单菌落点到 TTC 下层培养基培养 48 h, 再倒入 TTC 上层培养基培养 2 h, 将所用的单菌落进行比对, 挑选出颜色比较深的 26 株单菌落, 结果如图 1 所示. 菌株编号为 1、6、7、16、17、18、22、25 的菌株颜色较

深 选择这 8 株菌作为发酵用的菌株.

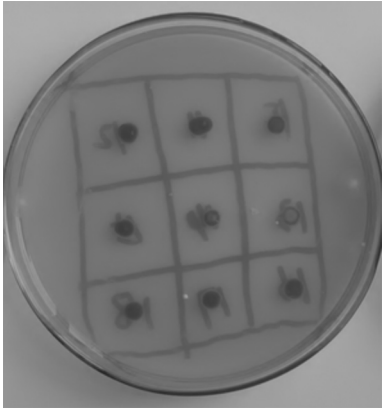


图 1 复筛结果

2.4 标准曲线的制作

标准曲线的制作过程和结果见表 2 和图 2.  
表 2 标准曲线制作过程

试管编号	乙醇体积浓度 /%	$OD_{610}$
0	0.0	0.00
1	0.1	0.10
2	0.2	0.19
3	0.3	0.29
4	0.4	0.37
5	0.5	0.49
6	0.6	0.57
7	0.7	0.67

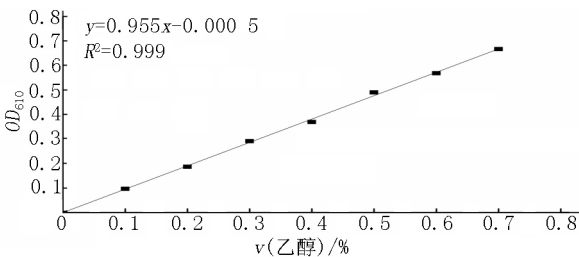


图 2 乙醇标准曲线

由图 2 可知 ,该乙醇标准曲线线性方程为  $Y = 0.955 X - 0.0005$  , $R^2 = 0.999$  ,误差较小.

2.5 发酵液中乙醇含量的测定

将选择的 8 株菌株发酵 72 h 后离心取上清液 ,测发酵液的  $OD_{610}$  结果见表 3.

表 3 发酵液中乙醇浓度的测定

菌株编号	$OD_{610}$	乙醇质量浓度 /( $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ )
1	0.218	2.11
6	0.222	2.14
7	0.220	2.13
16	0.219	2.12
17	0.218	2.11
18	0.220	2.13
22	0.220	2.13
25	0.218	2.11

由表 3 可知 ,这 8 株菌产乙醇的能力相似 ,发酵

液中乙醇的质量浓度为  $2.11 \sim 2.14 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  ,这可能是由于在豆豉发酵过程中高盐、低湿度、高温和低氧环境下 ,大部分的微生物( 包括一些病原菌) 生长都受到了抑制 ,而能够耐受该恶劣环境的菌株生存了下来 ,并且以优势菌株的形式存在<sup>[17]</sup> .该菌株能够以优势菌的形式存在 ,说明该菌株适应了豆豉发酵过程中的恶劣环境 ,初步判定有可能是耐高温、耐旱、耐盐和厌氧或者兼性厌氧类的菌 ,至于具体是什么菌 ,还要对其进行形态学鉴定和分子生物学鉴定 ,由于这些菌株产酒精的能力相近 ,则随机选取 6 号菌株作下一步的形态学鉴定.

2.6 形态学鉴定

图 3 是在 100 倍显微镜下的该菌株图片 .由图 3 可知 ,该菌株个头较大 ,有排列成链状的趋势 ,而且出现了出芽生殖的现象 .根据文献 [18] ,初步确定 6 号菌株为酵母菌.

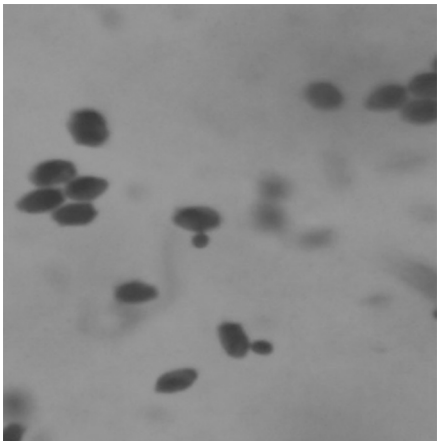


图 3 菌株 100 倍显微图片

2.7 分子生物学鉴定

2.7.1 总 DNA 的提取 总 DNA 的提取结果如图 4 所示 .由图 4 可知 ,在 marker 的右边出现亮带 ,说明总 DNA 提取成功 ,可以用作 ITS PCR 扩增.

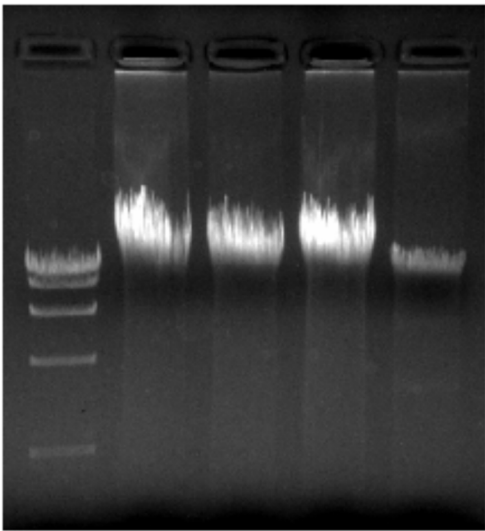


图 4 总 DNA 电泳图

2.7.2 PCR 扩增片段 PCR 扩增结果如图 5 所示。由图 5 的 PCR 样品扩增条带可以看出,在大约 800 bp 左右的地方出现了亮带,说明 ITS 序列扩增成功,而且该序列大小为 800 bp 左右。

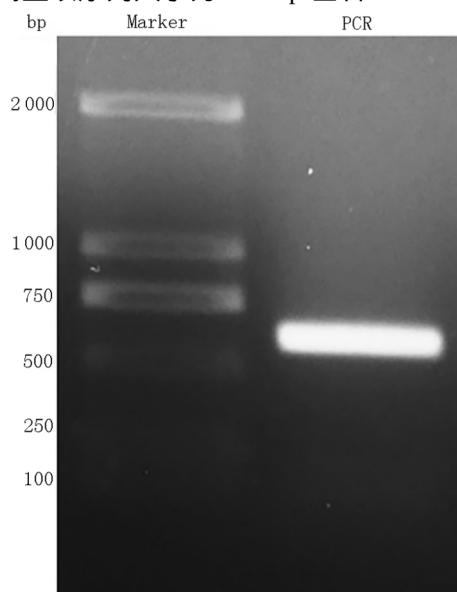


图5 PCR 扩增条带

2.7.3 测序及系统进化树的构建 送去上海生工测得的 ITS 序列全长为 697 bp 和 PCR 扩增所得的条带预测值相似,将该序列输入 NCBI 中,利用的 Blast 功能将同源性相近的其它几个序列进行同源性比对,用 MEGA 6.06 软件进行序列比对和系统进化树的构建,发现有 1 株 GenBank 号为 KC881067.1 的酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)同源性最高,相似度高达 100%,因此该菌株为酿酒酵母,系统进化树见图 6,该 ITS 序列为

CGGTGGAGTTATATTTTGAATGGATTTTTTTGT  
TTTGGCAAGAGCATGAGAGCTTTTACTGGGCAAGA  
AGACAAGAGATGGAGAGTCCAGCCGGGCTGCGC  
TTAAGTGGCGGCTCTTGCTAGGCTTGTAACTTTCTTT  
CTTGCTATTCCAAACGGTGAGAGATTTCTGTGCTTTT  
GTTATAGGACAATTAAAACCGTTTCAATACAACAC  
ACTGTGGAGTTTTCATATCTTTGCAACTTTTTCTTTG  
GGCATTCGAGCAATCGGGGCCAGAGGTAACAAA  
CACAAACAATTTTATTTATTCATTAAATTTTTGTCAA  
AAACAAGAATTTTCGTAAGTGAATTTTAAATAT  
TAAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTCGCA  
TCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCCATACGTAATG  
TGAATTGCAGAAATCCGTGAATCATCGAATCTTTGA  
ACGCACATTGCGCCCTTGGTATTCCAGGGGGCAT  
GCCTGTTTGAGCGTCATTTCTTCTCAAACATTCTG  
TTTGCTAGTGAGTGATACTCTTTGGAGTTAACTTGA  
AATTGCTGGCCTTTTCATTGGATGTTTTTTTCCAAA  
GAGAGGTTTCTCTCGGTGCTTGAGGTATAATGCAAG  
TACGTCGTTTTAGGTTTTACCAACTGCGGCTAATC

TTTTTATACTGAGCGTATTGGAACGTTATCGATAA  
GAAGAGAGCGTCTAGGCGAACAATGTTCTTAAAG  
TTTGACCTCAAATCAGGTAGGAGTACCCGCTGAA  
CTTAAGCATATCAAA

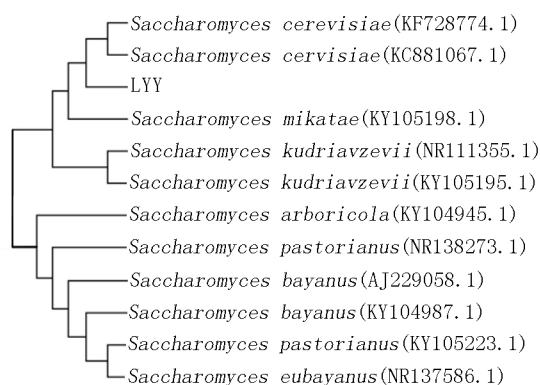


图6 系统进化树

### 3 结论

本实验通过采样传统曲霉型豆豉中发酵第 12 天的样品,经过分离纯化和筛选得到 1 株高产酒精优势菌株,再以乙醇浓度为指标,筛选出产酒精能力较高的菌株。对这株菌株进行形态学和分子生物学鉴定,综合菌株的形态学特征及同源性和系统发育分析,将该菌株鉴定为酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)。

在传统发酵食品中酵母菌的筛选例子有很多,刘丽音等<sup>[19]</sup>从腊鱼和香肠中筛选出 5 株产香酵母菌,经鉴定有 2 株是汉逊德巴利氏酵母(*Debaryomyces hansenii*),3 株菌为异常威克汉姆酵母(*Wickerhamomyces anomalus*)。刘贞等<sup>[20]</sup>从发酵的米浆中筛选出 1 株高产酒精的酵母菌,经鉴定为卡斯特酒香酵母(*Brettanomyces custersii*)。本实验筛选出为酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*),产酒精能力为  $2.14 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。宋瑶等<sup>[21]</sup>从中国传统大曲酒等基质中分离出 1 株发酵性能优良的酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*),该文献报道,酿酒酵母具有耐高温并且在高温条件下产酒精能力比普通的酵母高。在豆豉发酵过程中,尤其是在后发酵阶段,发酵池中的温度高达  $55^\circ\text{C}$ <sup>[22]</sup>,说明酿酒酵母可在高温下生存并产生酒精增加豆豉的风味。酿酒酵母除了具有耐热的性能外,还具有耐酸的能力,葛隐等<sup>[23]</sup>从五粮液窖池中分离和筛选出 1 株耐酸性酿酒酵母菌,该酵母可以在  $\text{pH}$  值  $\leq 3.5$  的环境下生存。在风味形成方面,酿酒酵母比一般的酵母在在羟基丙酮、丙醇、琥珀酸、甘油等成分含量上有较大差异<sup>[24]</sup>,这对于豆豉独特风味的形成具有非常重要的贡献。

本实验筛选的酿酒酵母在豆豉发酵过程中起着非常重要的作用,如果能对酿酒酵母和生长条件等进行进一步了解,就有可能缩短发酵时间,调高豆豉

的品质,这对于传统豆豉发酵迈向纯种发酵具有重大意义,也为改善传统豆豉的风味和对其进行更多的开发利用提供科学理论依据。

#### 4 参考文献

- [1] 胡会萍,刘丹赤,殷丽君,等.豆豉后发酵中优势菌株筛选及其生产性能[J].食品科学,2014,5(17):146-152.
- [2] 张建华.曲霉型豆豉发酵机理及其功能性的研究[D].北京:中国农业大学,2003.
- [3] 宋永生,张炳文.日本纳豆与中国豆豉营养成分的研究进展[J].中国调味品,2004,12(1):6-9.
- [4] 李江伟,冉国侠.豆豉溶栓酶的分离纯化及其体外溶栓作用[J].中国生化药物杂志,1999,20(3):148-150.
- [5] 赵德安.豆豉的医疗生理作用[J].中国调味品,1998,12(7):9-11.
- [6] Okamoto A, Hanagata H, Kawamura Y, et al. Anti-hypertensive substances in fermented soybean natto [J]. Plant Food Hum Nutr, 1995, 47(1): 39-47.
- [7] Ikeda Y, Iki M, Morita A, et al. Intake of fermented soybeans natto is associated with reduced bone loss in postmenopausal women: Japanese population-based osteoporosis (JPOS) study [J]. The Journal of Nutrition, 2006, 136(5): 1323-1328.
- [8] 陈志文,徐尔尼,肖美燕.纳豆激酶的研究进展[J].食品科学,2002,23(10):130-134.
- [9] 谢秋玲,郭勇.纳豆:一种多功能食品[J].食品工业科技,1999,20(1):71-72.
- [10] 胡升,梅乐和,姚善泾.响应面法优化纳豆激酶液体发酵[J].食品与发酵工业,2003,29(1):13-17.
- [11] 管泳宇.曲霉型豆豉发酵分析及人工接种发酵研究[D].扬州:扬州大学,2013.
- [12] 孙建刚.发酵食品存在的安全隐患[J].中国检验检疫,2006,1(4):61-67.
- [13] 李祥.细菌型豆豉生产的研究[J].中国调味品,1999,23(10):14-17.
- [14] 孙森.天然发酵豆豉后发酵过程的动态分析[D].济南:山东轻工业学院,2008.
- [15] 陈清婵.米曲霉发酵豆豉挥发性风味成分及其在加工过程中变化研究[D].武汉:华中农业大学,2011.
- [16] 毛志群,张伟,檀建新,等.燃料乙醇用高产酒精酵母的筛选及鉴定[J].酿酒,2003,30(3):35-37.
- [17] Chen Tingtao, Wang Mengjuan, Jiang Shuying, et al. Investigation of the microbial changes during koji-making process of Douchi by culture-dependent techniques and PCR-DGGE [J]. International Journal of Food Science and Technology, 2011, 46(9): 1878-1883.
- [18] 吴帅,肖冬光,原通磊,等.高耐性酿酒酵母菌种的筛选[J].酿酒科技,2006,12(9):37-40.
- [19] 刘英丽,李文采,张慧娟,等.传统发酵食品产香酵母菌的筛选及其发酵产香特性研究[J].中国食品学报,2015,15(4):63-70.
- [20] 刘贞,刘小翠,赵思明,等.发酵米浆中高发酵性能酵母菌和乳酸菌的筛选和鉴定[J].食品科学,2010,31(7):232-235.
- [21] 宋瑶,缪礼鸿,高素芹,等.耐高温酒精酵母菌株的筛选及发酵能力比较[J].中国酿造,2009,28(5):38-42.
- [22] Chen Tingtao, Wang Mengjuan, Li Shengjie, et al. Molecular identification of microbial community in surface and undersurface Douchi during postfermentation [J]. Journal of Food Science, 2014, 79(4): 653-658.
- [23] 葛隐,唐圣云,赵东,等.五粮液窖池中耐酸性酿酒酵母菌的分离与筛选[J].中国酿造,2010,29(8):130-133.
- [24] 汤晓宏,胡文效.葡萄酒酵母菌研究进展[J].中外葡萄与葡萄酒,2012,18(5):53-57.

## Directional Selection and Molecular Analysis of Yeast Strains with High Alcohol Yield in *Aspergillus*-Type Douchi

WAN Ming<sup>1</sup>, LIAO Yanyan<sup>2</sup>, WANG Xiaolan<sup>2\*</sup>

(1. Department of Basic Education, Nanchang Institute of Science and Technology, Nanchang Jiangxi 330108, China;

2. College of Life Science, Jiangxi Provincial Key Laboratory of Protection and Utilization of Subtropical Plant Resources, Jiangxi Normal University, Nanchang Jiangxi 330022, China)

**Abstract:** The microorganisms in this study were isolated, first screened and second screened from the fermentation stage of *Aspergillus*-type douchi by using TTC medium. Finally a high-yield alcohol strain was gotten, the ability of producing alcohol was  $2.14 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  by using the potassium chromate method. By the morphological identification and ITS molecular biological identification, which included putting the ITS sequence into NCBI for BLAST to comprise with other high similarity sequences and constructing the phylogenetic tree, it was found that the similarity between the strain number 6 and the *Saccharomyces cerevisiae* reached up to 100%. Finally, combining the morphological identification with the molecular biological identification, the strain No. 6 was identified as *Saccharomyces cerevisiae*. The high-yield alcohol strain *Saccharomyces cerevisiae* from this study lay a good foundation for latter producing the better flavor of douchi, meanwhile provides a good bacterial source for Douchi industrialization.

**Key words:** Douchi; producing alcohol strains; screening; identification; *Saccharomyces cerevisiae*

(责任编辑: 刘显亮)