

# 酱醪中耐盐酵母菌的分离鉴定及其耐盐性研究

方义川<sup>1</sup>, 李芬芳<sup>2,3</sup>, 胡文锋<sup>3</sup>, 高向阳<sup>3</sup>, 余世琴<sup>3</sup>, 谭志辉<sup>3</sup>, 肖运柱<sup>3</sup>, 刘良杰<sup>2</sup>, 黎艳珊<sup>2</sup>

(1. 汕头鱼露厂有限公司, 广东汕头 515021) (2. 中国热带农业科学院海口实验站, 海南海口 570102)

(3. 华南农业大学食品学院, 广东广州 510642)

**摘要:** 为了改善酱油及鱼露发酵过程及风味物质的产生, 本文拟从自制高盐稀态酱醪发酵酱醪中分离纯化耐盐酵母, 可作为产香酵母添加到酱醪或鱼露发酵过程。结果获得 6 株耐盐酵母菌, 通过含 3.0 mol/L NaCl 的固体培养基筛选出 5# 和 6# 两株耐盐性较好、活力旺盛的菌株; 经形态学、生理生化及 18S rDNA 鉴定, 为鲁氏结合酵母。两菌株均耐盐性能强, 且 6# 菌耐盐性能更优。

**关键词:** 酱油酱醪; 耐盐酵母; 鲁氏结合酵母

文章编号: 1673-9078(2012)8-922-926

## Isolation, Purification and Identification of Halotolerant

## Yeast from Soy Sauce Mash and Its Salt Tolerance

FANG Yi-chuan<sup>1</sup>, LI Fen-fang<sup>2</sup>, HU Wen-feng<sup>3</sup>, GAO Xiang-yang<sup>3</sup>, YU Shi-qin<sup>3</sup>,

TAN Zhi-hui<sup>3</sup>, XIAO Yun-zhu<sup>3</sup>, LIU Liang-jie<sup>2</sup>, LI Yan-shan<sup>2</sup>

(1. Shantou Fish Sauce Co., Ltd, Shantou 515021, China)

(2. Institute of Banana and Plantain, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences, Haikou 570102, China)

(3. College of Food Science, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

**Abstract:** Six strains of halotolerant yeast were isolated from the high-salt-liquid-state fermentation of the self-made soy sauce mash. They were cultivated with 3.0 mol/L NaCl on solid medium, and then the characteristics of colony were detected at different time. Two strains (5# and 6#) with the best salt tolerance ability, high activity and high alcohols production were selected. The strains were found as *Zygosaccharomyces rouxii* by morphological, physiological and biochemical, 18S rDNA identification.

**Key words:** soy sauce mash; salt tolerant yeast; *Zygosaccharomyces rouxii*

酱油及鱼露由多菌种协同发酵酿造而成。有机酸、氨基酸和芳香性物质的组成和含量常作为评价酱油质量指标, 其由酱醪质量所决定<sup>[1]</sup>。酱醪质量是多种菌群相互作用的结果<sup>[2]</sup>, 以增香型耐高盐酵母菌的参与尤为重要<sup>[3]</sup>。因此, 通过筛选得到优质的增香型耐高盐酵母菌株并将其应用于酱油的发酵中, 对改善酱油的风味和质量具有重要的意义。

目前, 为了得到耐盐能力强的酵母菌, 一般通过一定技术的诱变再筛选耐盐酵母菌。顾金兰等<sup>[4]</sup>以酿酒酵母单倍体为出发菌株, 通过紫外线和氯化锂复合诱变, 选育出耐盐酵母突变株, 其耐盐度由 10% 提高到

16%。赵红梅等<sup>[5]</sup>建立了从含糖量高的样品中分离耐高渗酵母的简单方法, 分离得到 1 株极耐高渗酿酒酵母, 该菌株能在 60% 的含糖培养基上生长。朱会霞等<sup>[6]</sup>研究了经过 <sup>60</sup>Co 诱变筛选得到了高产酒精耐盐酵母 Co-158 菌株。

因此, 本文拟从自制高盐稀态发酵酱油酱醪中分离纯化出耐盐酵母菌, 并通过含有 18% NaCl 的固体培养基筛选出耐盐性较好、活力旺盛且产醇能力强的菌株, 经形态学、生理生化和 18S rDNA 对其进行鉴定, 为酱醪及鱼露发酵提供新的菌种。

### 1 材料与amp;方法

#### 1.1 材料与试剂

##### 1.1.1 试验材料

以自制高盐稀态发酵酱油酱醪为分离耐盐酵母的材料, 其含 3.0 mol/L 的 NaCl。

##### 1.1.2 试剂

麦芽汁培养基, 生化试剂, 广州环凯微生物有限

收稿日期: 2012-06-01

基金项目: 广东省科技厅省部产学研结合项目 (2011B090400221); 广东省教育部产学研结合项目 (2009B090300106, 2010B09400038); 广东省科技厅农业攻关项目 (2010B020412001); 中山市科技局产学研项目 (2009CX027)

作者简介: 方义川 (1957-), 男, 工程师, 主要从事鱼露生产工作

通讯作者: 李芬芳 (1983-), 女, 硕士, 从事微生物学研究; 胡文锋 (1964-),

男, 博士, 副教授, 硕士, 从事食品微生物及发酵方面的教学和研究工作

公司；葡萄糖（分析纯）、蛋白胨生化试剂，上海伯奥生物科技有限公司；酵母膏，生化试剂，国药集团化学试剂有限公司。

分离筛选培养基（生长培养基含 3.0 mol/L NaCl，琼脂 2%，121 °C 高压灭菌 15 min）；YEPD（即葡萄糖-酵母汁-蛋白胨培养基），用于细胞培养，观察细胞形态；麦氏培养基，观察子囊；碳源基础培养基，氮源同化试验；无盐大豆培养基，分子鉴定用培养基；明胶培养基。

## 1.2 试验方法

### 1.2.1 耐盐酵母菌的分离及纯化

取酱醪 10 g，置于 90 mL 无菌水中，充分振荡。取 1 mL 酱醪的稀释样品置于无菌培养皿中，再将融化冷却至 45~50 °C 的分离培养基注入，待凝固后，于 28 °C 倒置培养 48~72 h。挑取大的单菌落，多次划线分离、纯化，之后镜检，直至得到纯化的菌种。挑取镜检确认为纯化了了的单菌落，于生长培养基中培养 36 h，在生长培养基斜面保藏于 4 °C 冰箱，同时制备甘油菌种保藏于 -20 °C。

### 1.2.2 耐盐酵母菌的形态学鉴定

将菌种接种到葡萄糖-酵母汁-蛋白胨液体培养基中，28 °C 培养 3~7 d，观察是否发酵、培养液是否混浊，是否形成环或岛，沉淀量多少及松紧状况，并对单菌落中的菌体进行简单染色用于镜检。将酵母在大豆汁琼脂培养基上划线，于 28 °C 培养 3~4 d，观察其菌落形态。

### 1.2.3 耐盐酵母菌的生理生化鉴定

1.2.3.1 酵母假菌丝的观察：将马铃薯培养基制成平板，菌株 25 °C 活化后，在平板上划线接种（每个平板 2~3 条），至少做 2 个平行，在菌线上盖上无菌盖玻片，在 28 °C 下培养 5~10 d。

1.2.3.2 发酵糖类试验：鉴定系统糖类包括：葡萄糖（GLU）、 $\alpha$ -甲基-D-葡萄糖甙（MDG）、甘油（GLY）、N-乙酰-葡萄糖甙（NAG）、酮基-葡萄糖酸盐（2-KG）、纤维二糖（CEL）、L-阿拉伯糖（ARA）、半乳糖（GAL）、乳糖（LAC）、D-木糖（XYL）、麦芽糖（MAL）、阿东醇（ADO）、己糖/蔗糖（SAC）、木糖醇（XLT）、海藻糖（TRE）、肌醇（INO）、松叁糖（MLZ）、山梨醇（SOR）、棉子糖（RAF）。

1.2.3.3 60%葡萄糖生长情况：每株酵母菌接 3 只含 60%葡萄糖 YEPD 斜面在 25 °C 条件下培养，培养 4 周，每周观察生长情况。

1.2.3.4 35 °C 生长情况：每株酵母菌接到 0 mol/L NaCl 的 YEPD 斜面，在 35 °C 条件下培养，观察生长情况。

1.2.3.5 明胶液化试验：菌种在大豆汁培养基活化后，

接种到明胶培养中，培养 3~5 d。观察前与 4 °C 放置，观察明胶有否液化，记录结果。

### 1.2.4 耐盐酵母菌的分子鉴定

1.2.4.1 样本预处理：对液体酵母培养物，取适量培养物，8000 r/min，4 °C 离心 5 min，并弃去上清液，在液氮或冰浴中研磨粉碎。

1.2.4.2 酵母 DNA 提取步骤：取不多于 50 mg 用液氮研磨后的菌体粉末，放入 2.0 mL 微量离心管中。用酵母总 DNA 提取试剂盒提取。

1.2.4.3 18S rDNA 的 PCR 扩增及测序：18S rDNA 鉴定：用于 PCR 扩增的引物为通用引物，正向引物 EF3(5'-TCCTCTAAATGACCAAGTTTG-3')；反向引物 EF4(5'-GGAAGGGR-TGTATTATTAG-3')<sup>[7]</sup>。

PCR 反应体系(50  $\mu$ L)为：10 $\times$ Buffer 5  $\mu$ L、10 mmol/L dNTP 2.0  $\mu$ L、10  $\mu$ mol/L 引物各 1.5  $\mu$ L、Taq 酶 0.5  $\mu$ L、模板 2.0  $\mu$ L、ddH<sub>2</sub>O 37.5  $\mu$ L，空白不加模板。

PCR 反应条件为 94 °C 预变性 5 min，94 °C 变性 40 s，退火温度 52 °C，72 °C 延伸 2.5 min。30 个循环，72 °C 延伸 10 min（TP600PCR Thermal Cycler Dice, Takara, 日本）。

阳性 PCR 产物由上海英骏生物技术有限公司进行测序，要求双向测序。将接拼后的结果通过国际互联网 <http://www.NCBI.nlm.nih.gov/>，与美国国立生物技术信息中心(NCBI)基因库进行序列比对分析和同源性比较。

### 1.2.5 酵母菌耐盐能力的检测

菌种培养：从酱油醪中分离并经鉴定的酵母菌于 YEPD 斜面活化，再接种于 YEPD 液体培养基，28 °C 培养 36 h。接种于 NaCl 浓度分别为 0、1.6、2.0、2.4、2.8、3.2、3.6、4.0 mol/L 的 YEPD 斜面培养基中，每天观察生长情况。

### 1.2.6 耐盐酵母在高盐环境的生长情况

1.2.6.1 YEPD 培养基的 NaCl 终浓度分别为 0、1.0、2.0、3.0 mol/L；250 mL 三角瓶装入 19.5 mL 培养基，灭菌备用。每个处理 3 个重复。

1.2.6.2 种子制备及批次培养：①活化菌株，把斜面菌种分别接入装有 6 mL YEPD 液体培养基的试管中，28 °C 培养 36 h，即为一级种子。②将一级种子接入装有 50 mL YEPD 液体培养基的 500 mL 三角瓶中，28 °C 培养 36 h，即为二级种子。③向装有 19.5 mL 含不同浓度的 NaCl 的 YEPD 培养基中接入二级种子 0.5 mL，于 28 °C 培养。④每隔 7 h 取样一次，每瓶取 1.5 mL 培养液，12000 rpm，4 °C 离心 2 min，弃上清液；真空干燥，称取菌体干重。

## 2 结果与分析

分离得到的6株候选酵母菌个体形态及菌落形态特征见表1。

### 2.1 耐盐酵母的筛选及培养特征

表1 分离所得候选6株酵母菌其菌落及细胞形态特征

Table 1 Morphological identification of isolated 6 candidate yeast strains

特征	菌种号					
	1#	2#	3#	4#	5#	6#
菌落形态	圆形凸起	圆形凸起	圆形凸起	圆形凸起	摺起	圆形凸起
	边缘整齐	边缘整齐	边缘整齐	边缘整齐	边缘不齐	边缘整齐
菌落颜色	乳白色	乳白色	乳白色	米白色	乳白色	乳白色
菌落表面	湿润	湿润	湿润	干燥	湿润	湿润
细胞形状	较大椭圆形	较大椭圆形	较大球形	较大不规则球状	圆球状	圆球状
细胞排列方式	单个排列	单个排列	单个排列	单个有类似假菌丝	单个排列	单个排列
培养基气味	略有醇香	略有醇香	略有醇香	有不愉快气味	较浓醇香	较浓醇香

从表1可看出, 由于4#菌株发酵后会产生不愉快的气味, 所以不能作为食品发酵使用菌种, 被淘汰。1#、2#、3#菌种在含盐量18%的培养基生长缓慢, 所以该三株菌种耐盐性低, 被淘汰。5#和6#在含盐量18%的平板上菌落生长快, 菌落直径较大, 耐盐性较强, 且以此两种菌株发酵形成的发酵产物, 具有较浓醇香, 因此, 5#和6#具有潜在的应用前景。因此对5#和6#两株菌种进行鉴定。

### 2.2 耐盐酵母的鉴定

#### 2.2.1 细胞形态特征

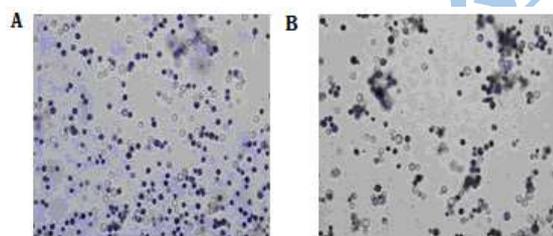


图1 美兰染色后的个体形态(A:5#, ×400倍; B:6#, ×400倍)

Fig.1 Morphological parameter of isolated yeast strains stained with methylene blue

如图1所示, 用美兰染色后在普通光学显微镜下放大400倍观察细胞形态, 5#和6#细胞形态为椭圆形或柠檬形、单生, 有小芽着生于大细胞的一端, 呈芽殖特征。上述特征与酵母菌相符<sup>[8]</sup>。

#### 2.2.2 子囊孢子

将酵母用马铃薯培养基活化2~3代后麦氏斜面培养基上, 于25℃培养3d~5d, 即可形成子囊孢子。

子囊孢子染色后镜检, 可看到菌体中出现有蓝色和紫红色两种颜色。其中蓝色为菌体, 紫红色为子囊孢子。在相同放大倍数(100倍), 5#菌比6#菌的菌体小。同样培养时间, 5#菌中子囊的密度要比6#多。

#### 2.2.3 生理生化鉴定

#### 2.2.3.1 发酵糖类试验

酵母糖发酵试剂盒试验结果见表2。

表2 5#和6#菌糖发酵结果

Table 2 Identification results of sugar fermentation of yeast 5# and 6#

糖种类	菌种号	
	5#	6#
0	-	-
葡萄糖	+	+
甘油	+	+
酮基-葡萄糖酸盐	-	-
L-阿拉伯糖	-	-
D-木糖	-	-
阿东醇	-	+
木糖醇	-	+
半乳糖	+	+
肌醇	-	-
山梨醇	+	+
α-甲基-D-葡萄糖甙	-	-
N-乙酰-葡萄糖甙	-	-
纤维二糖	-	-
乳糖	-	-
麦芽糖	+	+
己糖/蔗糖	+	-
海藻糖	-	-
松叁糖	-	-
棉子糖	+	-

注: “+”待鉴定菌在该糖为唯一碳源时能生长; “-”待鉴定菌在该糖为唯一碳源时不能生长。

#### 2.2.3.2 其他生化鉴定

两株待鉴定菌落在60% 葡萄糖的YEPD培养基中

能够生长；在35℃培养温度下能够形成菌落；明胶液化试验中5#和6#菌均能液化明胶，具有分解蛋白质的能力。

通过查询《酵母菌的特征及鉴定手册》，5#和6#菌均与接合酵母菌属和克鲁克酵母属的特征相符合。

### 2.2.4 18S rDNA同源性的鉴定

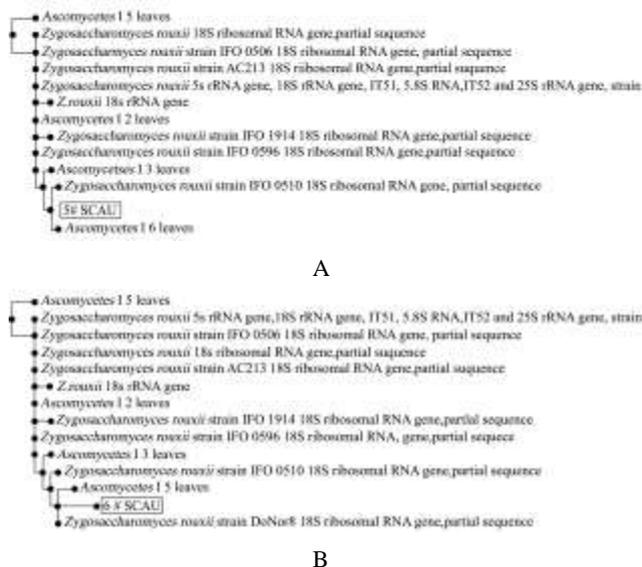


图3 以18S rDNA序列为基础的5#菌株(A)和6#菌株(B)系统发育树

Fig.3 Phylogenetic tree of yeast 5# (A) and 6# (B) based on 18S rDNA sequence

5#和6#菌染色体DNA用PCR扩增出单一条带(结果略),PCR产物回收纯化后经DNA测序,序列长度为1701 bp。将该序列应用BLAST软件与NCBI数据库中已有的细菌18S rDNA序列进行相似性比较,发现:5#菌株18SrDNA的全长序列与*Zygosaccharomyces rouxii*(鲁氏接合酵母)全长为1701核苷酸序列相比完全相同,同源性达到100%。以18S rRNA序列同源性为基础构建系统发育树。18S rRNA序列的查询ID为:5# SCAU,与NCBI数据库中鲁氏接合酵母的进化关系见图3(A)。

6#菌株的18S rDNA的全长序列与*Zygosaccharomyces rouxii*(鲁氏接合酵母)全长为1701核苷酸序列相比没有少核苷酸,只有7 bp的差异,同源性达99%。6#菌株18S rDNA序列的查询ID为:6# SCAU,比对序列见图3(B)。目前建议的标准是将具有99~100%全序列相似性的判定为一个种,具有97%~99%全序列相似性的判定为一个属<sup>[9]</sup>。因此,可判定6#菌株是与鲁氏接合酵母同一属的酵母菌。

### 2.3 酵母菌耐盐能力的测定

从表3中可以看出,5#和6#酵母菌均能在NaCl浓度3.6 mol/L以下生长,随着NaCl浓度的增加两株菌生长速度降低;当NaCl浓度达4.0 mol/L时,两株

均无生长迹象。

表3 酵母菌在含不同NaCl浓度的固体培养基上生长情况

Table 3 Growth of the yeast strains in solid medium with different NaCl concentrations

NaCl 浓度 / (mol/L)	0	1.6	2.0	2.4	2.8	3.2	3.6	4.0
5#长出时间/d	2	3	3	4	4	6	18	-
6#长出时间/d	2	3	3	4	4	7	21	-

注:“-”表示28℃培养四周(28d)后仍无生长迹象。

### 2.4 不同NaCl浓度下酵母菌的生长情况

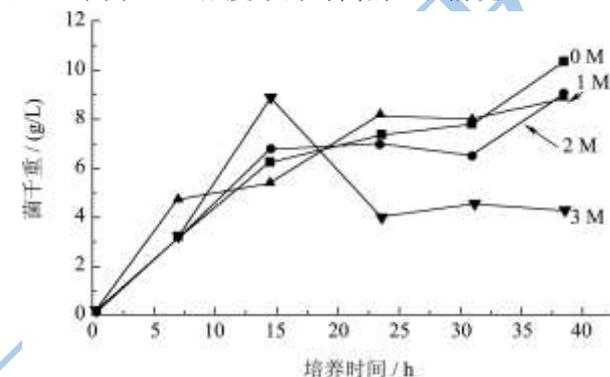


图4 5#酵母菌在含不同浓度NaCl的YEPD培养基的生长情况(28℃, 36h)

Fig.4 Growth curve of the yeast strain 5# in solid YEPD medium with different NaCl concentrations at 28℃

注:NaCl浓度分别为:0 mol/L(0M)、1.0 mol/L(1M)、2.0 mol/L(2M)、3.0 mol/L(3M)。

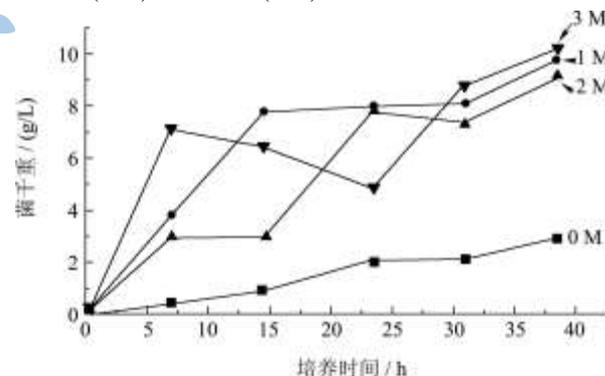


图5 6#菌在含不同浓度NaCl的YEPD培养基的生长情况(28℃, 36h)

Fig.5 Growth curve of the yeast strain 6# in solid YEPD medium with different NaCl concentrations at 28℃

注:NaCl浓度分别为:0 mol/L(0M)、1.0 mol/L(1M)、2.0 mol/L(2M)、3.0 mol/L(3M)。

由图4可知,两种酵母菌在没有加NaCl的YEPD培养基中,生长平缓,5#菌的生长情况明显优越于6#菌;5#酵母菌在添加1.0 mol/L和2.0 mol/L NaCl的YEPD培养基生长量与无NaCl的相似,说明此浓度的NaCl对其生长没有明显影响,甚至添加NaCl还有利其生长;当

NaCl浓度达3.0 mol/L时,对5#菌的生长有明显抑制作用,其生长量最低。

从图5可以看出,在添加NaCl的YEPD培养基,6#菌的生长量都高于无NaCl组;28℃培养36 h后,添加0、1.0、2.0和3.0 mol/L NaCl各组细胞干重分别为2.8 g/L、9.1 g/L、8.6 g/L和9.2 g/L,远高于无NaCl培养基,说明添加一定量的盐对其生长有利。

通过对比可以得出,两株酵母菌都具有较好的耐盐性能,且6#菌的耐盐性能比5#菌更优。

### 3 结论

3.1 通过从自制高盐稀态发酵酱醪中分离纯化出2株耐盐性较好、活力旺盛的菌株。筛选出的两菌株的发酵产物具有较浓醇香、耐盐性好,具有一定的工业化应用前景。

3.2 经形态学、生理生化和18S rDNA鉴定,其为鲁氏结合酵母。

3.3 两株菌均有较好的耐盐性能,且6#菌耐盐性能更优。

### 参考文献

[1] Zhang Yanfang, Tao Wen yi. Flavor and taste compounds analysis in Chinese solid fermented soy sauce [J]. African Journal of Biotechnology, 2009, 8(4): 673-681

- [2] O'Toole DK. The role of microorganisms in soy sauce production [J]. Advance in Applied Microbiology, 1997, 45: 87-152
- [3] Makino Y, Takegami I, Matsushita S, et al. Production of soy sauce by use of yeast cultured in a medium including waste water produced by desalted soy sauce lees [J]. Journal of the Japanese Society for Food Science and Technology, 1999, 46: 664-668
- [4] 顾金兰,王昌禄,程书梅,等.耐盐酵母的选育及其遗传特性的初步研究[J].中国酿造,2005,6:20-22
- [5] 赵红梅,刘景武,张伟.耐高渗酵母的分离、筛选及鉴定[J].食品研究与开发,2006,27(6):34-37
- [6] 朱会霞,孙金旭,张伟,等.高产酵母菌Co-158生理特性研究[J].酿酒科技,2007,5:20-23
- [7] Lan C Anderson, Colin D Campbell, James I. Prosser. Potential bias of fungal 18S rDNA and internal transcribed spacer polymerase chain reaction primers for estimating fungal biodiversity in soil [J]. Environmental Microbiology, 2003, 5(1): 36-47
- [8] 巴尼特 J.A.著,胡瑞卿译.酵母菌的特征与鉴定手册[M].青岛海洋大学出版社,1991
- [9] 吴飞,陈红英,胡承,等.浓香型白酒糟醋中可培养酵母18S rDNA全序列的系统学分析[J].酿酒科技,2006,4:23-25