

一株鸭梨酒酵母菌的鉴定

袁 丽¹, 王 颀¹, 高瑞昌²

(1. 河北农业大学食品科技学院, 河北 保定 071001; 2. 中国海洋大学生命科学与技术学部, 山东 青岛 266003)

摘 要: 从市售鸭梨果皮中分离出 1 株酵母菌, 经形态与培养特征、酵母假菌丝的观察、酵母菌子囊孢子的观察和生理生化试验, 初步鉴定将酵母菌株 GY 定为酵母属的酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*)。(孙悟)

关键词: 微生物; 酵母菌; 鉴定; 酿酒酵母

中图分类号: TS261.1; Q93-33 文献标识码: A 文章编号: 1001-9286(2005)05-0042-03

Identification of A Microzyme Strain

YUAN Li¹, WANG Jie¹ and GAO Rui-chang²

(1. Food Science & Technology College of Hebei Agriculture University, Baoding, Hebei 071001; 2. Life Science & Technology College of China Ocean University, Qingdao, Shandong 266003, China)

Abstract: A microzyme strain named GY was successfully separated from pear pericarp. Such strain was preliminarily identified as *Saccharomyces cerevisiae* through morphologic examination and relative biochemical experiments. (Tran. by YUE Yang)

Key words: microbe; yeast; identification; *Saccharomyces cerevisiae*

梨广泛分布在山东、河北等地, 是一种营养丰富、口味极佳的果品, 是继苹果和柑桔之后的第三大果树树种。近十年来鸭梨的种植面积在不断增大, 鸭梨资源非常丰富。但由于缺乏鸭梨深加工, 致使鸭梨价格有所下降。响应国家提倡酿造低度果酒的号召, 以鸭梨酿造鸭梨果酒, 成为缓解这一压力的有效途径。在果酒的酿造中, 菌种性能的好坏直接影响到果酒的质量。通过实验证明, 用市售的几种酵母菌酿造的鸭梨酒在感官评定上都不同程度地存在缺陷。这除了与鸭梨果实本身淡雅的风味有关外, 还与所用的酵母菌种有关。

本实验室从市售的鸭梨果皮中分离得到一株酵母菌, 命名为 GY, 它符合酿酒酵母的一般特征, 所酿造的鸭梨果酒具有较好的典型性, 是一株优良的适宜果酒酿造的酵母菌种。经过形态观察和生理生化试验, 该酵母菌被鉴定为酵母属中的酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*)。

1 材料与方法

1.1 材料

富集培养基: 麦芽汁培养基, 购自保定市八达啤酒

厂。

酵母菌分离培养基: 麦芽汁琼脂培养基。

酵母菌鉴定培养基: 参考《The yeasts: a taxonomic study》^[1]和《常见与常用真菌》^[2]。

生化鉴定糖类: 葡萄糖、半乳糖、麦芽糖、棉子糖、纤维二糖、肌醇、核糖、赤藓糖醇、鼠李糖、木糖、核糖醇、柠檬酸、琥珀酸、甘露糖、可溶性淀粉、阿拉伯糖、海藻糖, 均为分析纯。

其他试剂及材料: 主要有购自 Sigma 公司的放线菌酮、乙胺、尸胺, 市售玉米粉, 等等。

1.2 方法

酵母鉴定方法参考《The Yeast a taxonomic study》(第三版)^[1]。

1.2.1 形态与培养特征

将菌种接种到麦芽汁液体培养基中, 28℃ 培养 3~7 d, 观察是否发酵、培养液的清浊情况、是否形成环或岛、沉淀量多少以及松紧状况, 并用水浸法制片于显微镜下观察, 以目镜测微尺和镜台测微尺测其营养细胞的大小。将酵母在豆芽汁琼脂培养基平板上划线, 28℃ 培

收稿日期: 2004-09-27

作者简介: 袁丽 (1978-), 女, 山东人, 硕士, 助教, 发表论文数篇。

养 3~4 d,观察其菌落形态。

1.2.2 酵母假菌丝的观察

将已活化好的酵母划线于玉米粉琼脂培养基平板上,每个平板划 2~3 条,在菌线上盖以无菌盖玻片,28℃培养 5~10 d。镜检是否有假菌丝。

1.2.3 酵母菌子囊孢子的观察

在接种到生孢培养基之前,菌株在麦芽汁培养基上 25℃重新培养 1~2 d,进行活化。将已活化好的酵母在产孢子培养基斜面上划线,25℃培养 3 d,镜检是否有子囊孢子。如未见孢子需继续培养,保持 4~6 周,每周再检查是否出现子囊孢子。注意观察子囊形成前是否有接合现象,子囊与子囊孢子的形状,每一子囊内孢子的数目,孢子是否有颜色。

1.2.4 生理生化试验

进行生理生化试验的目的是将两株自选酵母鉴定到种,这些生理生化试验包括以下的发酵糖类试验、同化碳源试验、同化氮源(硝酸盐、乙胺、尸胺)试验、生成类淀粉化合物试验、无维生素生长测试、在 50%(w/w)葡萄糖-酵母膏中生长测试和在 1000 mg/L 放线菌酮抗性试验 6 个方面,其具体操作方法与步骤如下:

1.2.4.1 发酵糖类试验

鉴定所需发酵碳源为葡萄糖、麦芽糖、半乳糖、乳糖和蔗糖。

将上述糖分别加入到含有杜氏发酵管的生理生化培养基中,使之含量达到 50 mmol/L,经过滤(0.20 μm)除菌。酵母菌经活化后分别接入到上述培养基中,25℃培养 2~4 周后观察,以杜氏小管中有气泡计为阳性,无气泡为阴性。试验重复 3 次。

1.2.4.2 同化碳源试验

鉴定所需同化物质共 18 种,为半乳糖、棉籽糖、赤藓糖醇、蔗糖、可溶性淀粉、核糖醇、麦芽糖、D-木糖、D-甘露糖醇、纤维二糖、L-阿拉伯糖、琥珀酸、海藻糖、D-核糖、柠檬酸、乳糖、L-鼠李糖和肌醇。

将上述糖分别加入到生理生化培养基中,使之含量达到 50 mmol/L,经过滤(0.20 μm)除菌。酵母菌经活化后分别接入到上述培养基中,25℃条件下培养 2~4 周后观察,以试管中出现混浊计为阳性,否则计为阴性。第一次观察为阴性的试管,为了防止出现假阳性,需要再转接一次。重复 3 次,以不加糖的培养基为对照。

结果观察标准:将已培养数天的试管于混合振荡器上摇动,使内容物充分混匀。在一张白色卡片上画一条约 3/4 mm 宽的线,将卡片紧靠试管,直对自然光观察,如果管中溶液的混浊度完全将线掩盖,记此结果为+++;如果透过试管中溶液仅能看到不连续的线段,则记

为++;如果能看到不连续线段的清晰边缘,则记为+;如果溶液非常澄清,记为-,即说明未有酵母生长。

1.2.4.3 同化硝酸盐、乙胺、尸胺试验

该试验主要考察酵母菌在分别以硝酸盐、乙胺和尸胺为唯一氮源时的生长情况,向同化碳源培养基中加入硝酸盐,加入量为 0.078%(w/w),115℃灭菌 20 min。向同化碳源培养基中加入乙胺(尸胺),加入量为乙胺 0.064%(w/w),尸胺 0.068%(w/w),过滤(0.20 μm)除菌,接种已活化好的酵母,于 25℃培养 1 周。试验重复 3 次,以不加硝酸盐、乙胺和尸胺的培养基为对照。结果观察标准同碳源同化测试。

1.2.4.4 生成类淀粉化合物试验

将培养基倒平板(平板厚度约为培养皿高度的 1/3),接种已活化好的酵母,于 28℃培养 1~2 周后,在平板长菌处周围滴加刘格氏碘液,凡能产生类淀粉化合物的酵母会在菌落周围呈现蓝色。

1.2.4.5 无维生素生长测试

培养基经过滤(0.20 μm)除菌,无菌操作接种已活化好的酵母菌,25℃培养 7 d 后观察。为避免由于接种而混入的微量维生素而引起的误差,可将已培养 7 d 的初始培养液作为酵母的活化液,取少量接种到另一无维生素培养基试管中,经 25℃培养 7 d 后观察结果。结果观察标准如碳源同化测试,如果试管中溶液呈现+++ ,则说明该酵母具有合成生长所需的维生素的能力;若为++或+,则说明无此能力。

1.2.4.6 在 50%(w/w)葡萄糖-酵母膏中生长测试

将 50 g 葡萄糖溶于 50 mL 含有 0.1%酵母膏的水中,然后加入 3%(w/v)琼脂,溶解后分装试管,每管 5 mL,115℃灭菌 10 min,取出做斜面(注意:灭菌过度将会导致培养基褐变,灭菌后已褐变的培养基不易再用)。将已活化好的酵母在上述培养基斜面上划线,经 25℃培养 5 d 后观察有无生长现象。为防止培养期间由于水分蒸发而导致培养基的渗透压进一步加大,可用不透气的塑料纸将试管密封。

1.2.4.7 1000 mg/L 放线菌酮抗性测试

溶解 1 g 放线菌酮于 2.5 mL 丙酮中,向丙酮溶液中加入 6.7 g 氮源基础培养基,再加入含 10 g 葡萄糖的蒸馏水,充分混匀后过滤(0.20 μm)除菌,该溶液含放线菌酮 10000 mg/L。取上述溶液 0.5 mL 加入到含 4.5 mL 蒸馏水(以高压灭菌)的试管中,为含 1000 mg/L 放线菌酮的培养基。向培养基中接种已活化好的酵母,于 25℃培养 3 周。结果观察标准同碳源同化测试。+ 阳性,生长较快;+s 阳性,生长较慢;- (+) 阴性,但有少量生长;- 阴性,没有生长。

2 结果与分析

2.1 酵母菌细胞形态和培养特征

将酵母菌 GY 接种于麦芽汁培养基中,于 28℃ 培养 3 d 后,镜检。观察其形态、生殖方式、有无假菌丝等情况,并用目镜测微尺测量细胞的大小。结果见表 1。

表 1 酵母菌的细胞形态				
菌名	形状	大小(μm)	繁殖方式	有无假菌丝
GY	椭圆形	5.4×(3.86~7.85)	两端出芽	无

酵母菌 GY 在麦芽汁液体培养基中培养 7 d 后,不形成醭,菌液浑浊,产气明显,有沉淀;在麦芽汁琼脂培养基上生长的菌落为乳白色,圆形,有光泽,边缘整齐,粘稠,易挑起;在生孢子 Kleyn 培养基上 28℃ 培养 1~4 周后,有子囊孢子形成;两者均能形成 1 2 4 个子囊孢子,孢子壁光滑,见图 1~3;在有盖玻片的玉米粉琼脂培养基上 25℃ 培养 10 d 左右,镜检不能形成假菌丝;无类淀粉化合物生成;在以硝酸钾为唯一氮源的培养基上不生长。综上所述,根据《The Yeasts: a taxonomic study》,可初步判断所筛选的两株酵母菌均属于酵母属^[1 3]。

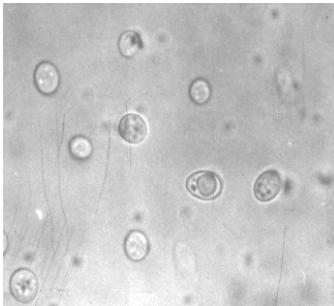


图 1 酵母菌 GY 生成 1 个孢子 (x100b)

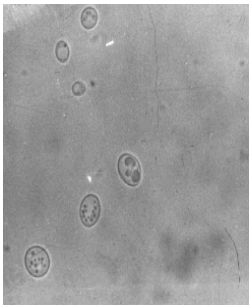


图 2 酵母菌 GY 生成 2 个孢子 (x100b)

2.2 生理生化试验

2.2.1 发酵糖试验(见表 2)

表 2 菌株 GY 糖类发酵结果					
糖类	葡萄糖	蔗糖	麦芽糖	半乳糖	乳糖
结果	+	+	+	+	-

2.2.2 同化碳源试验 (见表 3)

2.2.3 其他生理试验 (见表 4)

3 结论

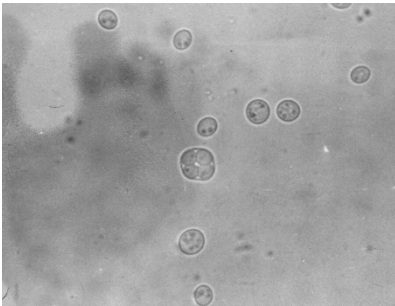


图 3 酵母菌 GY 生成 4 个孢子 (x100b)

表 3 酵母菌 GY 同化碳源试验结果					
碳源	结果	碳源	结果	碳源	结果
肌醇	-	纤维二糖	-	淀粉	-
蔗糖	++	鼠李糖	-	柠檬酸	-
麦芽糖	++	木糖	-	海藻糖	+++
半乳糖	++	琥珀酸	-	赤藓糖醇	-
乳糖	-	核糖醇	-	阿拉伯糖	-
棉籽糖	++	核糖	-	甘露糖醇	-

注:“-”表示非常澄清;“++”表示透过试管能看到不连续线段的清晰边缘;“+++”表示浑浊度较高,完全将标记线掩盖。

表 4 酵母菌 GY 其他生理试验结果			
项目	结果	项目	结果
硝酸钾同化	-	50%葡萄糖-酵母膏生长	-
盐酸乙胺同化	-	37℃ 生长	++
盐酸尸胺同化	-	在 1000 mg/L 放线菌酮中生长	-
无维生素生长	+++		

注:“+++”表示浑浊度极高;“++”表示浑浊度较高;“-”表示完全澄清。

根据以上鉴定结果,参考文献[1]和[4],自选酵母菌株 GY 为酵母属的酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*)。

参考文献:

[1] N.Y kregger-van Rij Groningen. The Yeasts:a Taxonomic Study. Third revised and enlarged edition[M]. The Netherlands:El-Seviser Science Publisher B.V.,1984.

[2] 中国科学院微生物研究所《常见与常用真菌》编写组. 常见与常用微生物[M].北京:科学出版社,1978.

[3] 张纪忠. 微生物学分类[M]. 上海:复旦大学出版社,1990. 364-398.

[4] 周德庆. 微生物学分册[M]. 上海:上海科学技术出版社,1986.

更正

本刊 2005 年第 4 期第 30 页图注“沈怡方等专家……”应为“沈怡方等专家……”;第 104 页李增胜同志的作者简介中将其学历误为大学本科,应更正为“1954 年毕业于山西轻工学校食品专业”,在此,向专家、作者及广大读者致歉。

特此更正

《酿酒科技》编辑部
2005 年 4 月 28 日