

两株野生沙棘酵母菌株的分子生物学鉴定及其发酵特性

王曦,田瑞华,万永青,魏立杰,崔洪飞

(内蒙古农业大学生命科学学院,内蒙古 呼和浩特 010018)

摘要: 应用 26S rDNA D1/D2 区域序列测定和系统发育分析,对从野生沙棘果中分离出的两株酵母菌 JHZ3、WKZ1-2 进行了鉴定。结果表明,其分别为葡萄汁有孢汉逊酵母 (*Hanseniaspora uvarum*) 和戴尔凯氏有孢圆酵母 (*Torulaspora delbrueckii*)。对这两株菌发酵特性的研究表明,JHZ3 和 WKZ1-2 在较强酸性条件下发酵能力强。

关键词: 微生物;沙棘;酵母菌;26SrDNA;WL;鉴定

中图分类号:Q93-3;TS261.1;TS262.7 文献标识码:A 文章编号:1001-9286(2012)05-0060-05

Molecular Biological Identification of Two Wild Sea Buckthorn Strains and the Fermentation Characteristics

WANG Xi, TIAN Ruihua, WAN Yongqing, WEI Lijie and CUI Hongfei

(College of Life Science, Inner Mongolia Agricultural University, Huhhot, Inner Mongolia 010018, China)

Abstract: 26S rDNA D1 / D2 area sequencing and system development analysis was applied to identify two yeast strains JHZ3 and WKZ1-2 isolated from wild sea buckthorn fruits. The results showed that they were spore han Hudson yeast (*Hanseniaspora uvarum*) and DaiErKai's spore round yeast (*Torulaspora delbrueckii*) respectively. The research on their fermenting performance indicated that JHZ3 was better than WKZ1-2 in fermenting capacity in high acid conditions.

Key words: microbes; sea buckthorn; yeast; 26 SrDNA; WL; identification

沙棘 (*Hippophae rhamnoides* L.), 属胡颓子科沙棘属,野生灌木或乔木^[1],其浆果含有丰富的营养和生物活性物质。我国是世界上沙棘属植物类群分布最广的国家,沙棘资源蕴藏量最大,占世界沙棘总面积的 95% 以上,素有“沙棘王国”之称。

沙棘属于高纬度耐寒作物,其浆果上的酵母具有独特作用。在沙棘果酒的发酵过程中,酵母菌的选择极为重要,是影响沙棘果酒品质和典型性的重要因素。

由于酵母菌数目庞大,种间差异较大,给酵母菌的初步鉴定带来很大的不确定性。随着分子生物学技术的发展,一些分子水平的分类方法被应用于酵母菌分类中,主要包括 18S rDNA 序列分析、26S rDNA 序列分析、ITS1-5.8S rDNA-ITS2 序列分析等^[2]。26S rDNA D1/D2 区域位于大亚基的 5' -端,序列长度在 600 bp 左右^[3]。GUTEL L^[4]等研究表明,这段区域具有较高的变异率,可以用于亲缘关系较近的菌株之间的分类研究。目前,这一区域

列在酵母菌分类研究的所有分子生物学方法中是应用最多的。

本试验通过酵母菌发酵力、温度和 pH 值等特性指标试验^[5],从沙棘果中筛选出两株酵母菌 JHZ3 和 WKZ1-2,并通过 WL 营养琼脂培养基^[6]和 26S rDNA-D1/D2 区域序列分析将其分别初步鉴定为 *Hanseniaspora uvarum* 和 *Torulaspora delbrueckii*,为选育优良沙棘果酒酿造酵母提供参考。

1 材料与amp;方法

1.1 材料

1.1.1 菌株

在内蒙古呼和浩特市和林县境内的不同野生沙棘果林中无菌采摘沙棘果,从沙棘果表皮上分离、纯化出酵母菌株。

1.1.2 培养基

3% 麦芽浸粉新鲜培养基: 麦芽浸粉 30 g, dH₂O

收稿日期:2012-03-14

作者简介:王曦(1985-),男,汉族,天津人,在读硕士研究生,研究方向:发酵工程。

通讯作者:田瑞华,副研究员,发酵产物分离鉴定,trh8611@126.com。

优先数字出版时间:2012-03-23;地址:<http://www.cnki.net/kcms/detail/52.1051.TS.20120323.1008.002.html?uid=>。

1000 mL,灭菌。

2%麦芽浸粉固体培养基: 麦芽浸粉 20 g, dH₂O 1000 mL, 灭菌。

WL 营养琼脂培养基: 0.4% 酵母浸粉, 0.5% 蛋白胨, 5% 葡萄糖, 2% 琼脂, 储液 A(40 mL/1000 mL), 储液 B(1 mL/1000 mL), 调 pH 值至 6.5, 灭菌后, 加储液 C(1 mL/1000 mL)。

储液 A: 5.5 g 磷酸二氢钾, 4.25 g 氯化钾, 1.25 g 氯化钙, 1.25 g 硫酸镁, 混匀溶解并定容至 400 mL。

储液 B: 0.25 g 氯化铁, 0.25 g 硫酸锰, 混匀并定容至 100 mL。

储液 C: 0.44 g 溴甲酚绿, 水 10 mL, 酒精 10 mL。

1.1.3 主要试剂

酵母菌 26S rDNA D1/D2 区域序列扩增引物 NL1(5'-GCA TAT CAA TAA GCG GAG GAA AAG -3')和 NL4(5'-GGT CCG TGT TTC AAG ACG G-3'), 上海生工公司; 琼脂糖凝胶回收试剂盒, 天根生物科技有限公司; DNA marker, PCR 反应体系, 北京全时金生物科技有限公司; 琼脂糖, 中科瑞泰(北京)生物科技有限公司。

1.2 方法

1.2.1 菌株的分离与形态鉴定

将沙棘果粒置于麦芽浸粉液体培养基 28 °C 培养 2 d, 至培养液浑浊。将培养液稀释成适当的梯度(10⁻³~10⁻⁴), 取 1 mL 菌液, 涂布于麦芽浸粉平板, 28 °C 培养 2~3 d, 随机挑取单菌落, 在麦芽浸粉平板上划线纯化。将纯化好的菌株活化培养 2 d, 于 WL 营养培养基上进行划线分离, 28 °C 培养 5 d, 观察并记录菌落颜色以形态。

1.2.2 发酵力试验

本试验采用二氧化碳失重法。将菌株按 3% 的接种量接入 250 mL 三角瓶内, 培养基 pH 值为 5.0 的麦芽液体培养基, 然后置于 28 °C ± 1 °C 培养箱内培养 7 d 左右, 每天称重测二氧化碳失重量, 待发酵结束后, 以二氧化碳的减少量计算发酵力。

1.2.3 温度实验

准备装有 100 mL 麦芽液体培养基的 250 mL 三角瓶, 灭菌后接入 1% 的活化后菌液分别放入 20 °C、24 °C、28 °C、32 °C、36 °C 的培养箱内培养, 每个培养箱内放入 2 个平行和 1 个空白对照, 7 d 后用气相色谱仪测定酒精含量。

1.2.4 pH 值试验

准备装有 100 mL 麦芽液体培养基的三角瓶, 利用氢氧化钠和盐酸分别调节其 pH 值为 2.0、3.5、4.0、4.5、5.0、6.0, 每个值设 2 个平行, 并设 1 个空白对照。灭菌后接入 3% 的活化后菌液, 放入 28 °C 培养箱里培养, 每天

测其二氧化碳失重量。

1.2.5 26S rDNA D1/D2 区域序列扩增

用热裂解法微量提取酵母菌 DNA。PCR 反应体系(50 μL) 为: 2×Taq Master Mix 25 μL, 10 μmol/L 正向和反向引物各 1 μL, DNA 模版 2 μL, ddH₂O 21 μL; PCR 反应条件: 94 °C 预变性 3 min, 94 °C 变性 30 s, 53 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 45 s(30 个循环, 最后 72 °C 延伸 10 min)。

1.2.6 系统发育分析

取 PCR 产物在 1.4% 琼脂糖凝胶上电泳。电泳完毕后于紫外灯下切取目的条带, 进行凝胶回收, 将纯化好的 PCR 产物送北京华大基因进行测序。根据测序结果, 利用 BLAST 软件从 GenBank 核酸序列数据库中进行相似序列搜索(BLAST Search), 比较测序菌株与已知酵母菌相应序列的相似程度。为显示测序菌株和已知酵母菌的亲缘关系及系统地位, 根据相似序列搜索结果, 用 Clustal X 软件对测试菌株和相关菌株的多个序列进行匹配分析, 使用 MEGA 4 软件进行多序列对位排列, 并采用 MEGA 4 软件包中的 Kimura-Parameter Distance 模型及 Neighbour-joining 方法构建系统发育树, 并进行 1000 次 Bootstrap 检验。

2 结果与分析

2.1 菌株的形态鉴定

WL 营养琼脂培养基是被设计用来监测饮料发酵过程中微生物类群的一种非选择性培养基。Cavazza^[7]等研究表明, 在葡萄酒自然发酵过程中出现的大多数典型酵母菌种都可以用 WL 营养琼脂培养基根据菌落颜色及形态对其加以区分(见表 2)。

JHZ3、KKZ1-2 在 WL 营养琼脂培养基上的菌落形态见表 1。通过对两株酵母菌在 WL 营养琼脂培养基上的菌落颜色及形态差异的比较(图 1、图 2), 对照表 2 可以把 JHZ3 和 WKZ1-2 分别初步鉴定为 *Hanseniaspora uvarum* 和 *Torulasporea delbrueckii*。

表 1 JHZ3、WKZ1-2 在 WL 营养琼脂培养基上的形态描述

菌株	WL 形态描述	菌种
JHZ3	深绿色, 边缘白色, 菌落扁平, 表面光滑, 不透明, 黄油状	葡萄汁有孢汉逊酵母
WKZ1-2	奶油色, 带淡淡的绿色, 菌落球形突起, 表面光滑, 不透明, 奶油状	戴尔凯氏有孢圆酵母

2.2 发酵力试验

对菌株 JHZ3 和 KKZ1-2 在同等条件下进行发酵力测定。测定结果见表 3。由表 3 可见: 在相同试验条件下, 两菌株的发酵力随发酵时间的变化趋势是一致的。在 24 h 左右, 两菌株的发酵力最强, 发酵最为旺盛; 48 h 后两菌株的发酵力都明显减弱, 虽然在 96 h 有所回升,

表2 不同酵母菌在WL营养琼脂培养基上的菌落形态描述(Cavazza et al 1992)

菌种	菌落颜色	菌落形态
酿酒酵母	奶油色, 稍带绿色	球形突起, 表面光滑, 不透明, 奶油状
戴尔凯氏有孢圆酵母	奶油色, 稍带淡淡的绿色	球形突起, 表面光滑, 不透明, 奶油状
葡萄汁有孢汉逊酵母	深绿色	扁平, 表面光滑, 不透明, 黄油状
路氏类酵母	鲜绿色	球形突起, 突面, 表面光滑, 不透明, 奶油状
粟酒裂殖酵母	深绿色	菌落很小, 表面光滑, 不透明, 黄油状
红酵母	红色	球形突起, 突面, 表面光滑, 粘稠, 黄油状
美极梅奇酵母	奶油色, 带淡淡的红色, 底部红棕色	菌落小, 突面, 面粉状
膜璞毕赤酵母	灰绿色, 带淡淡的蓝色	较高的突面, 表面褶皱, 面粉状
克鲁维毕赤酵母	白色, 带淡绿色	扁平, 表面褶皱, 粗糙, 中间火山状
异常汉逊酵母	奶油色至灰蓝色、蓝色, 8 d 后出现	扁平, 表面光滑, 奶油状
中间型酒香酵母	奶油色, 8 d 后出现	菌落小, 较高的圆屋顶状突起, 表面光滑, 奶油状
拜耳接合酵母	奶油色	菌落小, 较高的圆屋顶状突起, 表面光滑, 奶油状
假丝酵母	中央奶油色, 边缘绿色	扁平, 表面光滑, 不透明

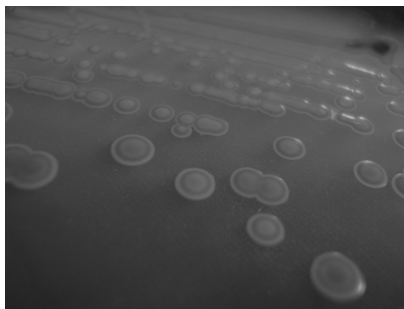


图1 JHZ3 在 WL 营养琼脂培养基上的菌落形态

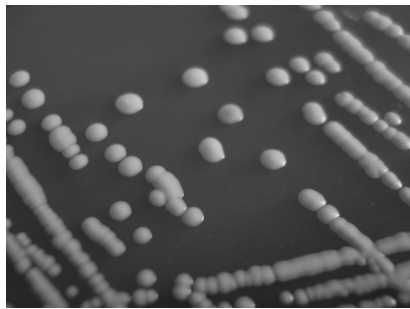


图2 WKZ1-2 在 WL 营养琼脂培养基上的菌落形态

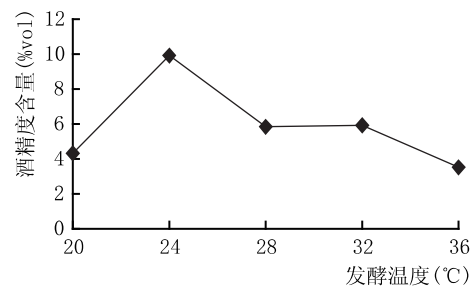


图3 JHZ3 酒精含量随温度的变化趋势图

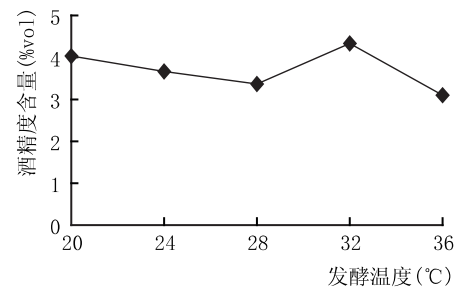


图4 WKZ1-2 酒精含量随温度的变化趋势图

但整体仍呈下降趋势。同时,从表3也可以看出,菌株WKZ1-2的发酵力明显高于JHZ3。

表3 菌株JHZ3和WLZ1-2发酵力的比较 (g/250 mL)

菌株	发酵时间 (h)					
	24	48	72	96	120	144
JHZ3	0.86	0.61	0.49	0.58	0.52	0.48
WKZ1-2	0.86	0.68	0.57	0.66	0.58	0.51

2.3 温度对菌株发酵的影响

根据发酵力试验结果,对菌株JHZ3和KKZ1-2在不同的温度下发酵144h后的酒精含量进行测定,结果见图3、图4。

从图3可以看出,JHZ3在24°C左右时,酒精含量达到最大值,接近10%vol,说明在此温度下,发酵能力最

强;当温度超过24°C时,酒精含量大幅度下降,说明较高温度对发酵的抑制作用明显。

从图4可以看出,WKZ1-2在20°C和32°C时都具有较高的酒精含量;但是从20°C到28°C,酒精含量下降幅度缓慢,温度对发酵的抑制作用不明显;当达到32°C时,酒精含量达到最大值,接近4.5%vol,说明在此温度下,发酵能力最强;随着温度的进一步升高,发酵酒精含量大幅度下降,说明,高温对发酵的抑制作用明显。

2.4 最适生长pH值

根据温度实验,对菌株JHZ3在不同发酵pH值下以24°C发酵144h,测定二氧化碳失重量,结果见图5;菌株WKZ1-2在32°C的二氧化碳测定结果见图6。

由图5可知,pH值在4.0时,菌株JHZ3的二氧化碳失重量最大。当pH值升高至4.5时,二氧化碳失重量的

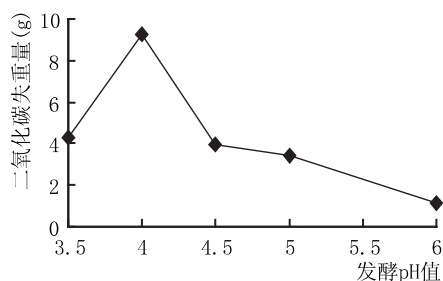


图5 JHZ3 二氧化碳失重量随发酵 pH 值的变化

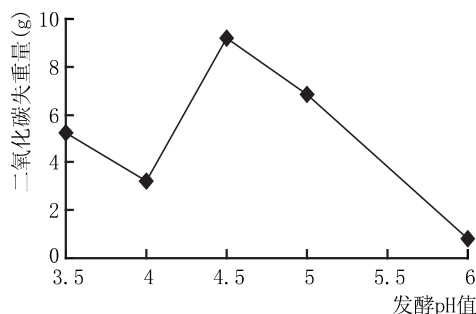


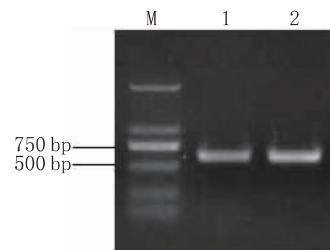
图6 WKZ1-2 二氧化碳失重量随发酵 pH 值的变化

下降趋势显著,这说明,较高的酸性环境有利于菌株的发酵,也体现了从酸度较高的野生沙棘果筛选到的酵母菌株的特殊性。

由图6可知,pH值在3.5~4.5时,二氧化碳失重量的变化呈先减少再增加的趋势,pH4.5时,菌株WKZ1-2的二氧化碳失重量最大。随着pH值的进一步升高,二氧化碳失重量的下降趋势显著,这说明,菌株可能由于自身的某种调节机制而适应较高的酸性环境,以此选择最适宜的生长环境。从整个发酵发展趋势来看,该菌株的最适pH值为4.5。

2.5 酵母菌株 26S rDNA D1/D2 区域序列扩增

对菌株JHZ3和WKZ1-2进行PCR扩增、电泳检测(图7),其目的条带片段均在600bp左右。将产物回收、纯化,由北京华大基因公司测序。



M:DL2000 DNA Marker;1:JHZ3;2:WKZ1-2

图7 26S rDNA D1/D2 区域序列扩增产物电泳图

2.6 系统发育分析

测序结果表明,菌株JHZ3和WKZ1-2的26S rDNA D1/D2区域基因序列分别为592bp和572bp。将两菌株的26S rDNA D1/D2序列与Genbank数据库中的已知的模式菌株序列进行比对分析,构建系统发育树(图8)。

从图8中可以看到,JHZ3、WKZ1-2分别位于*Hanseniaspora uvarum*、*Torulaspota delbrueckii*两个独立分支上。JHZ3与*Hanseniaspora uvarum*同源率为99.12%,WKZ1-2与*Torulaspota delbrueckii*的同源率为99.64%。根据Peterson和Kurtzman确定的大亚基5'端D1/D2区域的差异范围,即在同种间菌株的差异不超过1%^[8],可以确定JHZ3为*Hanseniaspora uvarum*种,WKZ1-2为*Torulaspota delbrueckii*种。

3 讨论

沙棘属高纬度耐寒作物,从其果实表面筛选出了两株酿酒酵母菌种—*Hanseniaspora uvarum*和*Torulaspota delbrueckii*,属于分布较广的菌种。WL营养琼脂培养基在初步鉴定酿酒酵母的菌种中得到了较为广泛的应用,但是大多都是对从葡萄上分离的酵母菌株进行研究。通过查阅文献,还从未有人应用从沙棘果上分离的酵母菌株。本研究可以证明,WL营养琼脂培养基在对野生沙棘果酵母的菌株鉴定方面是具有一定的准确性与可行性的。

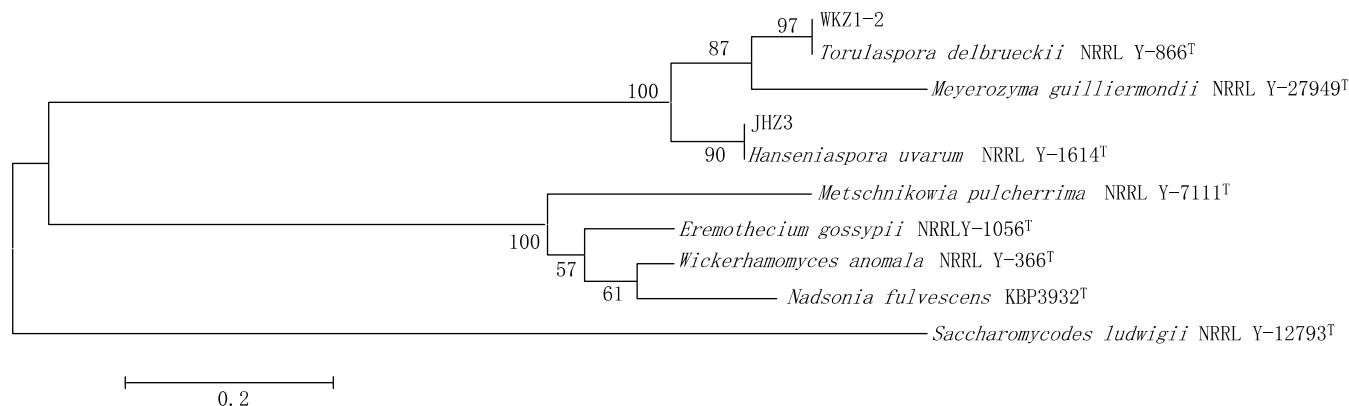


图8 JHZ3、WKZ1-2 26S rDNA D1/D2 区域基因序列系统发育树

通过相关特性试验研究,发现 JHZ3 在较高酸性条件下发酵能力强。天然沙棘浆果的 pH 值约为 2.0,这表明,沙棘酵母在长期的自然驯化过程中已经适应了较高的酸性环境,这为耐酸酵母菌株的筛选提供了一个新的样品资源。

参考文献:

- [1] 丁小林,秦利平.沙棘中的营养成分与生物活性物质研究进展[J].中国食品与营养,2008(9):57-59.
- [2] 周春艳,张秀玲,王冠蕾.酵母菌的5种鉴定方法[J].中国酿造,2006(8):51-54.
- [3] 王庆国,刘天明.酵母菌分类学方法研究进展[J].微生物学杂志,2007,27(3):97-98.

- [4] Gutel, I R. R. & Fox, G E. Com pilation of large subunit RNA sequences presented in a structural from at[J]. Nucleic A cid Res, 1988, 16: 175-269.
- [5] 刘玉琼,霍向东,史从武,等.新疆石榴酒酒专用用酵母的选育及应用研究[J].食品科学,2009,30(11):211-215.
- [6] 杨莹,徐艳文,薛军侠,刘延琳.WL 营养琼脂对葡萄酒相关酵母的鉴定效果验证[J].微生物学杂志,2007,5(27):76-77.
- [7] Cavazza A, Grando M S, Zini C. Rilevazione della flora microbica di mostie vini[J]. Vignevini, 1992,9: 17-20.
- [8] Peterson S W, Kurtzman C P. Ribosomal RNA sequence divergence among sibling species of yeasts[J]. Systematic and applied microbiology, 1990, 14(2): 124-129.

(上接第 59 页)

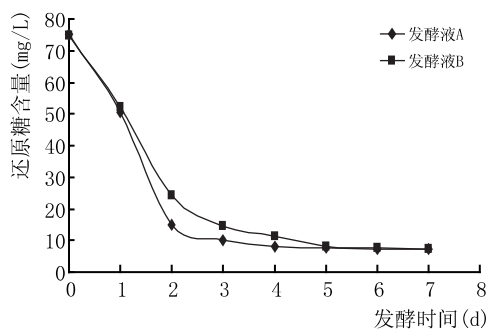


图 4 发酵液中总还原糖含量的变化

菌株双乙酰峰值高,还原能力减弱;基因工程菌株实际发酵度降低;基因工程菌株与对照菌株产酒精能力相近。

尽管基因工程菌在各项指标上都有不同程度的下降,但数值都在正常范围内,因此基因工程菌株具有可应用于保健啤酒生产的潜能。

参考文献:

- [1] 徐斌.啤酒生产问答[M].北京:中国轻工业出版社,1993:1-3.
- [2] 黄南方.啤酒质量识别及其营养价值[J].农牧产品开发,1999

- (4):36-38.
- [3] 顾国贤.啤酒与健康[J].酿酒,2001(2):33-34.
- [4] 王瑞刚,王水平.外源蛋白表达系统及利用植物表达外源蛋白的特点与优势[J].生物学通报,2003,38(1):11-12.
- [5] 张伟,刘志敏,等.酵母蛋白分泌途径的研究进展[J].生物技术通讯,2006,17(1):81-83.
- [6] 吴丽娟,蒋建新,等.酵母表达系统及其应用研究[J].生命的化学,2003,23(1):46-49.
- [7] 郑敏,张飞雄,等.酵母表达系统表达外源基因的研究进展[J].首都师范大学学报:自然科学版,1999,20(4):73-77.
- [8] Cereghino JL, Cregg JM. Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*[J]. FEMS Microbiol Rev, 2000, 24(1):45-66.
- [9] Cregg JM, Cereghino JL, et al. Recombinant protein expression in *Pichia pastoris*[J]. Mol Biotechnol. 2000, 16(1):23-52.
- [10] GB4928—1991.啤酒试验方法[S].
- [11] 唐明官,唐是雯.啤酒酿造[M].北京:轻工业出版社,1990:221-242.
- [12] 管敦仪.啤酒工业手册(修订版)[M].北京:中国轻工业出版社,2007.

湖北枝江酒业首季突破 20 亿元产值大关

本刊讯 2012年4月6日,笔者从湖北省枝江市经济和信息化局获悉:今年1~3月,湖北枝江酒业集团积极应对高端白酒市场出现萎缩,全国白酒销售量明显下滑的不利局面,逆势而上,突破20亿元产值大关,胜利实现首季开门红。完成现价工业总产值211759.4万元,比2011年同期的159389.3万元增长23.5%;实现销售工业总产值211698.4万元,比2011年同期的159469.7万元增长32.8%;实现工业产品销售率100%;生产枝江系列白酒(折65度、商品量)29000千升,比2011年同期的26000千升增长11.5%。

今年第一季度,湖北枝江酒业第三届卫冕省委、省政府命名的“全省最佳文明单位”,第三次夺取被誉为“宜昌经济奥斯卡”的“宜昌经济年度贡献企业”奖。湖北枝江酒业总经理张春雷获评“2011年宜昌经济年度杰出人物”,董事长蒋红星被枝江市委、市政府作为第二届“枝江市道德模范”,授予“助人为乐模范”荣誉称号。(杨至爱)