



王丽群. 传统酸面团中优势酵母菌的分离及鉴定[J]. 黑龙江农业科学, 2021(6):93-96, 97.

传统酸面团中优势酵母菌的分离及鉴定

王丽群

(黑龙江省农业科学院 食品加工研究所, 黑龙江 哈尔滨 150086)

摘要:为充分挖掘性状优良的可用于发酵面制品生产的酵母菌发酵剂菌种资源,采集黑龙江地区私人家庭长期用于馒头等发酵面制品制作的传统自然发酵酸面团,均质化并梯度稀释后,稀释液培养于马铃薯琼脂培养基中,从而对传统酸面团样品中的优势酵母菌进行分离及纯化,并分别对其形成的菌落及菌体细胞特征进行形态学描述,随后提取酵母菌分离菌株的基因组 DNA,通过 PCR 扩增其 26S rDNA D1/D2 区基因并测序,利用 MEGA 软件构建同属内菌种的系统发育树,通过亲缘关系远近对酵母菌分离菌株的种属加以鉴定。结果表明:从黑龙江地区采集的 5 份传统酸面团样品中,共分离出 19 株酵母菌,其中 18 株为酿酒酵母,1 株为异常威克汉姆酵母,可为工业酵母菌发酵剂菌种的开发提供候选菌株。

关键词:酸面团;酵母菌;酿酒酵母;威克汉姆酵母

酸面团是用于制作馒头、面包等发酵面制品时的发酵剂,俗称面引子,在我国已有 2000 年的应用史^[1]。目前,世界各国人们已经获得了工业化生产发酵面制品的纯种发酵剂,多为酿酒酵母,纯种发酵剂具有发酵时间短、品质稳定等优点。然而,越来越多的研究显示,相比于工业化单一菌种发酵面制品,传统酸面团制作的发酵面制品具有更好的风味及质构,这主要取决于菌种的特性,传统酸面团中菌种丰富,其富含的酵母菌已鉴定的超过 30 种^[2],除了酿酒酵母外,还有霍氏假丝酵母、葡萄汁酵母、葡萄汁有孢汉逊酵母、发酵毕赤酵母等^[3-4],这些菌种在发酵过程中各司其职,互为补充,从而赋予了发酵面制品更优的感官性状。因此,从传统酸面团中发掘性状优良的酵母菌具有重要意义。文中以黑龙江地区采集的传统发酵酸面团为研究对象,从中分离优势酵母菌,并对其进行种属鉴定,以期为开发性状优良的工业酵母菌发酵剂菌种奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 样品 酸面团样品采集自黑龙江省不同家庭,长期手工制作馒头等发酵面制品,均为自然发酵形成。

1.1.2 培养基及试剂 YPD 培养基:酵母粉 1.0%,蛋白胨 2.0%,葡萄糖 2.0%,蒸馏水溶解,121 ℃湿热灭菌 15 min;PDA 琼脂培养基(青岛海博生物技术有限公司);酵母菌基因组提取试剂盒[天根生化科技(北京)有限公司];其他试剂均为国产分析纯。

1.1.3 主要仪器 ME203E 分析天平(梅特勒-托利多集团);H1650 离心机(湖南湘仪实验室仪器开发有限公司);DM500 显微镜[徕卡显微系统(上海)有限公司];SPX-20 生化培养箱(上海跃进医疗器械有限公司);T100 PCR 仪(美国 Bio-Rad 公司)。

1.2 方法

1.2.1 样品采集 无菌药匙采集酸面团样品,冰盒保存带回实验室,置于 4 ℃冰箱暂存备用。

1.2.2 酵母菌的分离 将酸面团样品在无菌条件下捣碎,并重悬于无菌生理盐水中,并对形成的菌悬液进行梯度稀释,随后取适当梯度稀释液涂布于 PDA 琼脂培养基,30 ℃恒温培养箱中培养 48 h 后,用接种环挑取单菌落,继续划线于 PDA 琼脂培养基,直至确定为纯菌。

1.2.3 酵母菌分离株的形态学特征观察 选取已纯化的疑似酵母菌,划线于 PDA 琼脂培养基 30 ℃培养 48 h,记录菌落的形态特征。随后,用接种环挑取单菌落均匀涂于载玻片上,结晶紫染色后,油镜观察菌体细胞特征。

1.2.4 酵母菌分离株的 26S rDNA D1/D2 区序列分析 疑似酵母菌分离株通过 26S rDNA D1/D2 区序列分析进行种属鉴定。选取已纯化的酵

收稿日期:2021-03-06

基金项目:黑龙江省政府博士后资助项目(LBH-Z15195);黑龙江省“百千万”工程科技重大专项(2019ZX08B02-2);国家水稻产业技术体系项目(CARS-01-45)。

作者简介:王丽群(1982—),女,博士,助理研究员,从事农产品加工及贮藏研究。E-mail:lqwang_work@163.com。

母菌分离株接种于 YPD 液体培养基,30 ℃ 培养 48 h,离心收集菌泥,采用酵母菌基因组 DNA 提取试剂盒分别提取酵母菌分离菌株的基因组 DNA,并以基因组 DNA 为模板,以 NL1(5'-GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG-3') 和 NL4(5'-GGTCCGTGTTTCAAGACGG-3')分别为正向引物和反向引物^[5],进行酵母菌分离菌株 26S rDNA D1/D2 区基因的 PCR 扩增。PCR 扩增条件为:94 ℃ 预变性 5 min;94 ℃ 变性 1 min,52 ℃ 退火 1 min,72 ℃ 延伸 2 min,循环 35 次;72 ℃ 延伸 10 min。

PCR 产物送至华大基因进行测序,并将测序获得的酵母菌分离株 26S rDNA D1/D2 区基因序列,分别通过 BLAST 比对分析,找到与其序列同源性最高的已知菌属。随后,从 GenBank 中获取酵母菌相应属内代表性模式菌株的 26S rDNA D1/D2 区基因序列,并利用 MEGA5.1 软件与分离菌株的 26S rDNA D1/D2 区基因序列进行多序列比较分析,构建相应属的系统发生树,从而鉴定分离菌株具体种的归属。

1.2.5 数据分析 基因序列数据采用 MEGA

5.1 软件进行多序列校准排齐,以 Neighbor Joining 法构建系统发生树,1 000 次随机抽样,计算自引导值以评估其置信度。

2 结果与分析

2.1 酵母菌的分离

选取可在 PDA 琼脂培养基上生长,且形成具有一定差异性的单菌落,进行分离株纯化,最终从 5 份酸面团样品中获得 19 株疑似酵母菌分离菌株,菌株分布如表 1 所示。

表 1 酵母菌分离株在酸面团样品中的分布

样品 编号	菌株编号	分离株 数量
1	Y1-1、Y1-2	2
2	Y2-1、Y2-2、Y2-3	3
3	Y3-1、Y3-2、Y3-3	3
4	Y4-1-1、Y4-1-2、Y4-2、Y4-3、Y4-4、Y4-5、Y4-6	7
5	Y5-1、Y5-2、Y5-3、Y5-4	4

2.2 酵母菌分离株的形态学特征

对 19 株疑似酵母菌分离菌株,经 30 ℃ 培养 48 h 形成的单菌落及菌体细胞特征描述如表 2 所示。所有分离菌株均具有典型的酵母菌菌落特

表 2 酵母菌分离株的菌落及菌体细胞特征

菌株	菌落特征								菌体细胞形态	
	形状	表面特征	隆起形状	边缘	表面光泽	质地	颜色	透明度	形状	排列方式
Y1-1	圆形	光滑	低凸	完整	光泽	黏稠	乳白	不透明	圆球	成簇,偶见单在、成对
Y1-2	圆形	光滑	高凸	完整	光泽	黏稠	乳白	不透明	圆球	单在,成对,成簇
Y2-1	圆形	光滑	低凸	完整	光泽	黏稠	乳白	不透明	圆球,椭球	单在,成对,成簇
Y2-2	圆形	光滑	高凸	完整	光泽	黏稠	乳白	不透明	圆球,椭球	单在,成对,成簇
Y2-3	圆形	光滑	低凸	完整	光泽	黏稠	乳白	不透明	椭球	单在,成对,成簇
Y3-1	圆形	光滑	低凸	完整	光泽	黏稠	乳白	不透明	椭球	单在,成对
Y3-2	圆形	光滑	高凸	完整	光泽	黏稠	乳白	不透明	椭球	单在,成对
Y3-3	圆形	光滑	低凸	完整	光泽	黏稠	乳白	不透明	椭球	单在,成对,成簇
Y4-1-1	圆形	光滑	低凸	完整	光泽	黏稠	乳白	不透明	圆球,椭球	单在,成对
Y4-1-2	圆形	光滑	高凸	完整	光泽	黏稠	乳白	不透明	圆球,椭球	单在,成对
Y4-2	圆形	光滑	低凸	完整	光泽	黏稠	乳白	不透明	圆球,偶有椭球	单在,成对
Y4-3	圆形	光滑	低凸	完整	光泽	黏稠	乳白	不透明	圆球,偶有椭球	单在,成对,成链
Y4-4	圆形	光滑	高凸	完整	光泽	黏稠	乳白	不透明	圆球,偶有椭球	单在,成对,成簇
Y4-5	圆形	光滑	低凸	完整	光泽	黏稠	乳白	不透明	圆球	单在,成对
Y4-6	圆形	光滑	低凸	完整	光泽	黏稠	乳白	不透明	圆球	单在,成对,成簇
Y5-1	圆形	光滑	低凸	完整	光泽	黏稠	乳白	不透明	椭球	单在,成对,成簇
Y5-2	圆形	光滑	高凸	完整	光泽	黏稠	乳白	不透明	椭球	单在,成对,成簇
Y5-3	圆形	光滑	低凸	完整	光泽	黏稠	乳白	不透明	圆球,椭球	单在,成对
Y5-4	圆形	光滑	低凸	完整	光泽	黏稠	乳白	不透明	椭球	单在,成对,成簇

征,圆形,边缘整齐完整,表面光滑有光泽,低凸起或高凸起,质地黏稠细腻的乳白色不透明菌落。菌体细胞大多数能看到芽殖的分裂方式,形状为圆球或椭圆形,排列方式多数为单个存在,部分成对存在,少部分成簇存在,偶有成链。

2.3 酵母菌分离株的 26S rDNA D1/D2 区序列分析

供试酵母菌分离株的 26S rDNA D1/D2 区序列分别使用 BLAST 进行比对分析,发现其中 18 株与酵母属内种的同源性最高。利用 MEGA5.1 软件,分别将供试菌株 26S rDNA D1/D2 区序列与 GenBank 数据库中已知的酵母属内代表性模式菌株的相应序列进行比较,并构建系统发育树,以非同属的乳酸克鲁维酵母(*Kluyveromyces lactis*)为外标,结果如图 1 所示。

示。菌株 Y1-1、Y1-2、Y2-1、Y2-2、Y2-3、Y3-1、Y3-3、Y4-1-1、Y4-1-2、Y4-2、Y4-3、Y4-4、Y4-5、Y4-6、Y5-1、Y5-2、Y5-3、Y5-4 同 *Saccharomyces cerevisiae* (GenBank 注册号为 AY048154) 亲缘关系最近,序列相似性大于 99%,故将上述 18 株菌鉴定为酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)。

同样的方法发现 Y3-2 分离菌株与毕赤酵母属内种的同源性最高,基于 26S rDNA D1/D2 区序列构建了毕赤酵母属内代表性模式菌株的系统发育树,以非同属的乳酸克鲁维酵母(*Kluyveromyces lactis*)为外标,结果如图 2 所示。菌株 Y3-2 同 *Wickerhamomyces anomalus* (GenBank 注册号为 EF550341) 亲缘关系最近,序列相似性大于 99%,故将该菌株鉴定为异常威克汉姆酵母(*Wickerhamomyces anomalus*)。

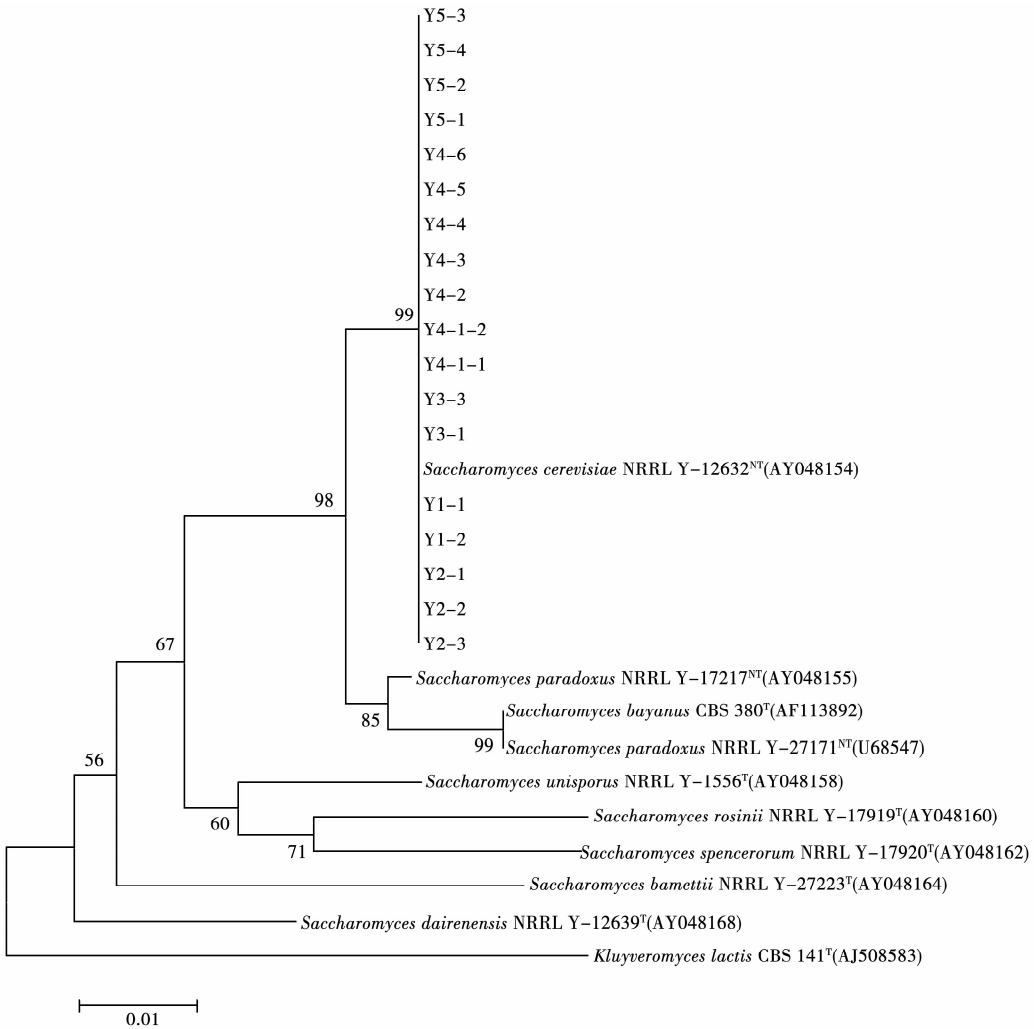


图 1 基于 26S rDNA D1/D2 区构建的酵母属系统发育树

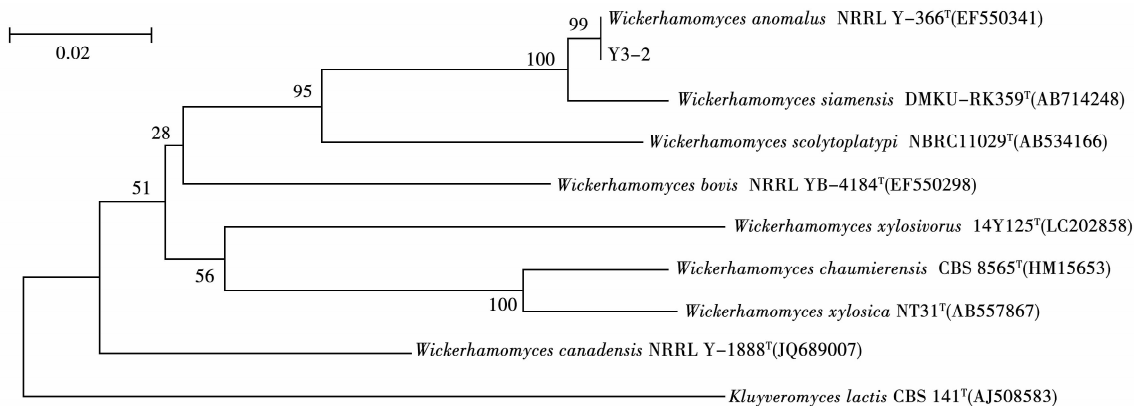


图 2 基于 26S rDNA D1/D2 区构建的威克汉姆酵母属系统发育树

3 讨论

酸面团在人类制作发酵面制品的历史上具有重要地位,其蕴含着大量微生物资源,主要包括酵母菌和乳酸菌。文中从黑龙江地区采集的传统酸面团样品中分离到 19 株优势酵母菌,其中 18 株为酿酒酵母,1 株为异常威克汉姆酵母,酿酒酵母在酸面团样品中占有绝对生长优势,这与已有研究报道一致,大部分研究报道均发现酿酒酵母是传统酸面团中最主要的优势酵母菌。例如,Landis 等^[6]对 500 份酸面团样品进行微生物多样性分析,发现 77% 的酸面团样品中酿酒酵母数量超过 50%;Zhang 等^[7]研究了分别来自河南、陕西、甘肃、安徽、黑龙江 5 个省的 25 个酸面团样品的酵母菌多样性,发现酿酒酵母为主要优势酵母菌,而热带假丝酵母次之。传统酸面团的菌种组成可能因不同国家和地区而异^[4,7],但也有研究报道认为酸面团的微生物多样性受地理位置影响不大,其可能更依赖于酸面团发酵剂的制作方法以及使用年限的长短^[6]。文中从传统酸面团样品中分离到一株异常威克汉姆酵母,其虽然并不属于酸面团中的主要优势菌,但在酸面团样品中也有发现^[2,6]。异常威克汉姆酵母相比于酿酒酵母,产气缓慢,但较为持久^[8],并且具有一定的产酯能力^[9],可以赋予发酵食品更好的风味,因此可以将异常威克汉姆酵母作为一种产香的补充发酵剂用于馒头等发酵面制品的生产以改善其风味特征。然而,酵母菌的性能具有菌种与菌株特异性,因此本研究中分离获得的酿酒酵母和异常威克汉姆酵母的具体发酵特性及功能性,仍有待于进一步深入研究。

4 结论

从黑龙江地区私人家庭长期用于制作馒头等

发酵面制品的传统自然发酵酸面团中分离获得 19 株酵母菌,经形态学及 26S rDNA D1/D2 区序列分析鉴定为酿酒酵母 18 株,异常威克汉姆酵母 1 株,可以作为候选酵母菌发酵剂菌种。

参考文献:

- [1] LIU T, LI Y, SADIQ F A, et al. Predominant yeasts in Chinese traditional sourdough and their influence on aroma formation in Chinese steamed bread[J]. Food Chemistry, 2018, 242: 404-411.
- [2] CHIVA R, CELADOR-LERA L, UNA J A, et al. Yeast biodiversity in fermented doughs and raw cereal matrices and the study of technological traits of selected strains isolated in Spain[J]. Microorganisms, 2021, 9(1): 47.
- [3] DE V L, NEYSENS P. The sourdough microflora; Biodiversity and metabolic interactions[J]. Trends in Food Science & Technology, 2005, 16(1): 43-56.
- [4] FRABERGER V, UNGER C, KUMMER C, et al. Insights into microbial diversity of traditional Austrian sourdough[J]. LWT-Food Science and Technology, 2020, 127: 109358.
- [5] KURTZMAN C P, ROBNETT C J. Identification and phylogeny of ascomycetous yeasts from analysis of nuclear large subunit(26S) ribosomal DNA partial sequences[J]. Antonie van Leeuwenhoek, 1998, 73: 331-371.
- [6] LANDIS E A, OLIVERIO A M, MCKENNEY E A, et al. The diversity and function of sourdough starter microbiomes[J]. eLife, 2021, 10: e61644.
- [7] ZHANG G, SADIQ F A, ZHU L, et al. Investigation of microbial communities of Chinese sourdoughs using culture-dependent and DGGE approaches[J]. Journal of Food Science, 2015, 80(11): M2535-M2542.
- [8] 马榕灿, 李志建, 胡惠影, 等. 酿酒酵母与异常威克汉姆酵母发酵面团特性比较研究[J]. 河南工业大学学报(自然科学版), 2017, 38(5): 22-25.
- [9] 史雁飞, 闫凤翔, 张泽锟, 等. 异常威克汉姆酵母 Y5-5 固定化条件优化及对其酿酒过程的影响[J]. 食品工业科技, 2019, 40(12): 45-50.



陈钰泉,李明芳,谭强. 枯草芽孢杆菌发酵中药皂素共表达蛋白酶及果胶酶的研究[J]. 黑龙江农业科学,2021(6):97-103.

枯草芽孢杆菌发酵中药皂素共表达蛋白酶及果胶酶的研究

陈钰泉¹,李明芳²,谭强¹

(1. 广西中医药大学药学院,广西 南宁 530200;2. 广西中医药大学第一附属医院,广西 南宁 530200)

摘要:为促进中药皂素的开发利用,本文采用单因素方法设置不同提取时间、温度、pH、料液比,以富含皂苷的4种中草药的混合水提液作为发酵基质用共表达蛋白酶和果胶酶的枯草芽孢杆菌或添加5%葡萄糖进行发酵,测定发酵前后发酵基质的洗涤效果、透光率和皂素变化。结果表明:提取中药皂素的条件为60℃,3h,pH9.0,料液比1:18。与发酵前相比,经枯草芽孢杆菌直接发酵后的皂素提取液洗涤效果提升了8.18%。添加5%葡萄糖后得到的发酵液的洗涤效果与蛋白酶及果胶酶的酶活呈正相关。两种发酵方式得到的发酵液透光率均在发酵32h达到最大。发酵前后皂素基本稳定不变。研究发现中药皂素经枯草芽孢杆菌发酵后的酶素液可以作为洗涤液的前期开发。

关键词:蛋白酶;果胶酶;洗涤效果;透光率;皂素

枯草芽孢杆菌属于革兰氏阳性好氧菌,自身没有致病性,对人和动物安全有益,是我国农业部公布的可直接饲喂动物且允许使用的益生菌菌种

之一,也是美国食品药品监督管理局公布的安全菌种,在当今工业酶的主要生产中有着广泛应用^[1-2]。枯草芽孢杆菌作为一种重要的发酵剂,可以分泌表达多种酶如蛋白酶、淀粉酶、果胶酶等。这些酶可广泛应用于工业生产,如利用枯草芽孢杆菌对大豆豆粕进行发酵,不仅可以显著提高发酵效果,还可以提高蛋白质的生物效价。

皂素作为一种表面活性分子,用水提取得到的皂素提取液除了皂素外,还含有大量适于微生物生长的营养物质。这些营养物质包括各种生物

收稿日期:2021-03-04

基金项目:国家自然科学基金(31360213);广西自然科学基金(2014GXNSFAA118176,2012GXNSFAA276037);南宁市科技计划(20131062);中国-东盟传统医药发展研究中心资助项目。

第一作者:陈钰泉(1991—),男,硕士,助教,从事药物新剂型、新制剂的研制与开发研究。E-mail:912497554@qq.com。

通信作者:谭强(1977—),男,博士,教授,从事药物新剂型、新制剂的研制与开发研究。E-mail:tan20111102@163.com。

Isolation and Identification of Predominant Yeast from Traditional Sourdough

WANG Li-qun

(Food Processing Institute, Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences, Harbin 150086, China)

Abstract: In order to fully tap the excellent yeast starter resources which can be used in the production of fermented flour products, in this paper, we collected the traditional natural fermented sour dough which has been used by private families in Heilongjiang Province for a long time, after homogenization and gradient dilution, the diluent was cultured in potato agar medium to isolate and purify the dominant yeast from traditional sour dough samples, the morphology of the colony and cell characteristics of the bacteria was described respectively. Then the genomic DNA of the yeast isolated strain was extracted, and the region of 26S rDNA D1/D2 was amplified by PCR and sequenced. The phylogenetic tree of the same genus was constructed by using MEGA software, and the species and genera of the yeast isolates were identified by their genetic relationship. The results showed that: a total of 19 yeast strains were isolated from 5 traditional sour dough samples collected in Heilongjiang Province, among which 18 strains were *Saccharomyces cerevisiae* and 1 strain was *Wickerhamomyces*, which could provide candidate strains for the development of industrial yeast starter strains

Keywords: sourdough; yeast; *Saccharomyces cerevisiae*; *Wickerhamomyces*