

酒精发酵菌株 K6 的分类鉴定及其发酵试验^{*}

Identification and Fermentation Test of a Yeast Strain

欧娜¹, 周志权², 孙文波¹, 莫祺晖¹

OU Na¹, ZHOU Zhi-quan², SUN Wen-bo¹, MO Qi-hui¹

(1. 广西科学院生物研究所, 广西南宁 530007; 2. 广西壮族自治区标准技术研究院, 广西南宁 530022)

(1. Biology Institute, Guangxi Academy of Sciences, Nanning, Guangxi, 530007, China; 2. Guangxi Institute of Standards and Technology, Nanning, Guangxi, 530022, China)

摘要:应用传统微生物分类方法和现代分子生物学鉴定方法对一株酒精发酵菌株 K6 的分类进行鉴定, 并对 3 种不同原料发酵检验其产酒精的效果。K6 生物学及生理生化特性与假丝酵母属 (*Candida*) 类似, 与酵母属的同源性达 98%, 比对的 *E* 值最小, 分值最高, 发育关系非常接近, 初步鉴定 K6 为假丝酵母属。K6 在木薯淀粉为原料的酒精发酵时, 缩短发酵时间 7~10h, 对 3 种原料平均产酒率提高 8.8%。表明菌株 K6 能够降低挥发酸, 缩短发酵时间, 提高产酒率。

关键词:酒精发酵 菌株鉴定 假丝酵母

中图分类号:TS261.1 **文献标识码:**A **文章编号:**1002-7378(2011)03-0202-03

Abstract: By traditional morphology and modern molecular biology identification, a yeast strain K6 is classified and identified. Ethanol production from 3 different feedstocks by strain K6 was detected. The biology, physiological and biochemical characteristic indicate the strain K6 is very similar to *Candida* that is 98% homologous to yeasts. According to the low *E* value with high score and very closely phylogenetic relationships, strain K6 can be preliminary determined as *Candida*. The fermentation time for strain K6 using cassava starch as feedstock can be reduced 7~10 hours. The ethanol yield of strain K6 from all three types of feedstock is increased 8.8%. These indicate that the strain K6 can decrease the volatile acid, shorten the fermentation time and increase ethanol yield.

Key words: ethanol fermentation, strain-identification, *Candida*

应用分子生物学方法从遗传进化角度阐明种群之间和种间内的分类学关系是微生物分类学的研究热点。分子生物学技术具有操作简便, 特异性高和准确性可靠等优点, 同时可以弥补某些通过传统形态分类学无法准确鉴定的不足, 现在已经广泛应用于微生物种鉴定工作中^[1]。酒精发酵菌株 K6 添加到酒精生产的发酵中, 不但能抑制杂菌生长, 稳定发酵环境; 而且能激发酵母活性, 缩短发酵时间; 还

能够有效转化原料中不易被酵母转化的不可发酵性糖, 大大提高酒精的产量。本文应用传统的微生物分类和现代分子生物学鉴定相结合的方法, 对一株酒精发酵菌株 K6 进行鉴定, 并对其发酵效果进行检验。

1 材料与方法

1.1 菌株

实验菌株 K6 由南宁市东凯生物工程有限公司提供。

1.2 培养基制备

基础液体培养基: 蛋白胨 0.2%、酵母膏 0.2%、葡萄糖 0.6%、KH₂PO₄ 0.02%, 蒸馏水配制, pH 值

收稿日期: 2010-09-14

作者简介: 欧娜 (1981-), 女, 主要从事微生物发酵与分子生物学方面的研究。

* 广西科学研究与技术开发计划项目 (桂科攻 0428005-6) 资助。

4.0~5.0,常规灭菌。

传代活化培养基:蛋白胨 1%、酵母膏 0.1%、葡萄糖 2%、 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.05%、琼脂 2%,自来水配制,自然 pH 值,常规灭菌后摆斜面。

豆芽汁液体培养基:黄豆芽 10%煮沸 30min,10%蔗糖,自然 pH 值,常规灭菌,固体则加 1.5%琼脂。

发酵培养基:甘蔗红糖 1.5%,蛋白胨 0.2%,豆粉 0.2%,硫酸镁 0.03%,磷酸二氢钾 0.03%,酵母膏 0.2%,牛肉膏 0.02%。

活性干酵母从武汉安琪酵母公司购买,糖蜜从平果凯特生物化工有限公司购买,木薯粉从平果凯特生物化工有限公司购买。

1.3 菌株的培养及形态特征观察

(1)将菌株 K6 接种于豆芽汁液体固体培养基中,28℃培养 3d,显微镜下观察其细胞的形态特征,用测微尺测定细胞大小;(2)将菌株 K6 接种于 Gorodkova 培养基上^[2],28℃培养 3~5d,涂片、染色观察子囊孢子的形成,连续观察 21d。(3)用划线法将菌株 K6 接种于马铃薯琼脂培养基中,在划线部分加无菌盖玻片,28℃培养 3~5d,取下盖玻片,放到洁净载玻片上,在显微镜下观察假菌丝的形状。(4)将菌株 K6 在 PDA 平板上“+”字划线接种,把接种后的培养皿倒置放入另一个 PDA 平板中,底层的培养皿放一个无菌载玻片,将两个培养皿扣紧,置 28℃培养 21d,如有掷孢子,则释放的掷孢子在下层培养基上形成菌落,取出载玻片上收集的掷孢子在显微镜下观察掷孢子形态^[3]。

1.4 生理生化特性试验

参照文献^[2]进行糖发酵、碳源同化、肌醇同化、氮源同化试验以及产类淀粉化合物、产酯、耐高渗透压等试验。

1.5 生物学特征观察

生长温度试验:在基础液体培养基中,接种相同的纯化菌株,设置不同的温度(℃)25,28,30,32,35,40,45,培养 14h,观察菌株生长情况,取样测定各个温度点的 OD_{600} 和出芽率。

生长 pH 值试验:在基础液体培养基中,接种相同的纯化菌株,分别设置不同的 pH 值 3.0、3.5、4.0、4.5、5.0、5.5、6.0、7.0、8.0,28℃培养 14h,观察菌株生长情况,取样测定各个 pH 值的 OD_{600} 和出芽率。

1.6 分子生物学鉴定

参照文献^[4]酵母总 DNA 快速分离方法提取

菌株的总 DNA。用酵母菌 18SrDNA 区段的特异引物进行 PCR 扩增,引物序列,上游引物为

5'-CAAGACGTGGAGCGTGCGG-3',

下游引物为

5'-TGTAGTGCGCGTGTCGCC-3',

由上海生工生物有限公司合成。PCR 反应程序为 95℃预变性 2min,94℃变性 1min,54℃复性 30s,72℃延伸 2min,共 30 个循环。72℃延伸 10min,所得 PCR 产物经试剂盒(上海生工生物有限公司)纯化后,送上海生工生物有限公司进行测序。利用 GeneBank 公共资源数据库中的 BLASTn 分析软件进行同源性分析。

1.7 菌株发酵试验

分别按照文献^[5]中的工艺流程图,添加 0.04%菌株 K6 到发酵中,检测残余还原糖、酒份、挥发酸等发酵指标。

2 结果与分析

2.1 菌株 K6 的形态特征

由图 1 可以看出,菌株 K6 菌落特征为典型的酵母菌落:乳白色,表面光泽、湿润,突起,圆形,边缘规则整齐,易挑起,挑起时呈黏糊状,液体培养 2d 后三角瓶底部出现白色沉淀,表面有醭膜;细胞多形态,椭圆、卵圆,长、短卵形,细胞大小为($5\mu m \times 5\mu m$)~($2.6\mu m \times 10\mu m$);繁殖方式为芽殖,一端、两端或多边芽殖,有假菌丝(图 2),无子囊孢子,无掷孢子。在豆汁液体培养基中,28℃培养 1d 后,细胞大部分呈短卵形,3d 后细胞伸长变为长卵形,有时接近圆形,为($2.6\sim 5$) $\mu m \times (10\sim 11)\mu m$ 。在豆汁固体培养基中生长,28℃培养 1d 后,细胞大部分呈长卵形,3d 后细胞多为长棒状,有的芽体也伸长,呈长棒状,细胞大小为($2.6\sim 3$) $\mu m \times (10\sim 25)\mu m$ 。在发酵试验中,发酵培养基接种菌株 K6 后,70h 后观察细胞为圆形,细胞为($6\sim 7$) $\mu m \times (8\sim 9)\mu m$ 。



图 1 菌株 K6

2.2 菌株 K6 的生理生化特性

糖发酵、碳源同化、氮源同化试验结果表明,K6

能发酵及同化葡萄糖、麦芽糖、果糖、蔗糖、半乳糖、甘露糖、木糖；不能发酵乳糖、可溶性淀粉、山梨糖、松三糖；可以同化蛋白胨、硫酸胺，不同化硝酸钾。此外，在类淀粉化合物试验中，滴加路哥氏(Lugol)碘液1~2滴，观察发现颜色没变化，说明菌株K6不产生类淀粉化合物。产酯试验中，摇床培养3d后，取下试管棉塞，可闻到淡淡的酒香味和酯的特殊香气，判断K6能产酯。耐高渗透压试验中，将纯化的培养菌株划线接种于含50%，60%葡萄糖和1%酵母膏溶液的琼脂培养基中，30℃下培养，2d后发现菌株均能生长，说明该菌种能耐高渗透压。将纯化的培养菌株从斜面刮取两环做成菌体悬浮液，取1%接种到不同NaCl浓度梯度的耐NaCl液体培养基^[2]中，观察其发酵情况，2d后发现，在13%NaCl浓度中，菌体能发酵产乙醇，说明该菌种能耐13%NaCl浓度。

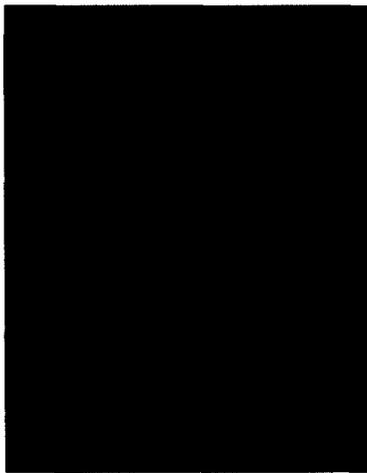


图2 菌株K6的假菌丝

2.3 菌株K6生物学特性

从表1、表2可以看出，菌株在微酸的环境中能生长，pH值4.0~4.5时生长良好，在碱性环境中生长受到抑制，几乎不生长；菌株能耐40℃的高温，但是在28~32℃时生长最好。

表1 不同pH值对菌株生长的影响

pH值	菌液光密度(OD ₆₀₀ 值)	出芽率(%)
3.0	0.3	4
3.5	0.8	10
4.0	1.7	70
4.5	2.0	80
5.0	1.9	60
5.5	1.5	30
6.0	1.4	20
7.0	0.2	0
8.0	0.1	0

2.4 菌株K6分子生物学鉴定结果

图3结果显示，菌株K6的18S rDNA序列与Candida的同源性达到98%，比对的E值最小，分值最高，发育关系非常接近，这与生理学鉴定结果相一致。

表2 不同的温度对菌株生长的影响

温度(℃)	菌液光密度(OD ₆₀₀ 值)	出芽率(%)
25	1.0	5
28	1.7	50
30	2.0	80
32	1.8	80
35	1.3	40
40	0.6	15
45	0.2	7

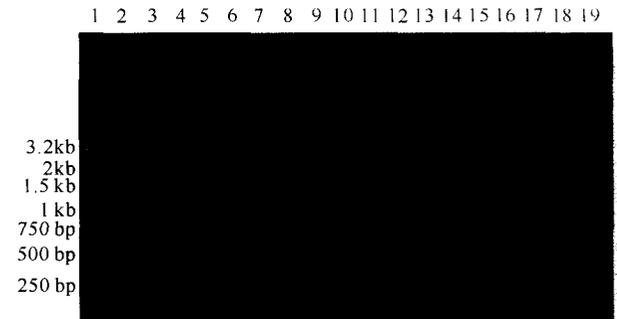


图3 ITS 26D1/D2 18S 基因组 DNA*

* 2、6、10、15 为空白对照，1:W2003Marke, 3~5:ITS, 7~9:26D1/D2, 11~13:18SrDNA, 14:W2003 Marker, 16~18:基因组 DNA, 19:λDNA/Hind Marker。

2.5 菌株K6发酵试验结果

表3结果表明，菌株K6在3种不同原料的酒精发酵试验中的效果都很明显，都能降低挥发酸，缩短发酵时间，提高酒份，其中，在木薯淀粉为原料的酒精发酵中的应用效果更为显著，可以缩短发酵时间7~10h，平均提高酒份8.8%。

表3 菌剂K6在3种原料中的发酵结果

原料	菌剂添加量(%)	酒份(度)	挥发酸(以HAC%计)	残余还原糖(%)	酵母数(亿/毫升)	发酵时间(h)
糖蜜	0	7.6	0.026	0.56	1.2	56
	0.04	8.15	0.018	0.39	2.4	48
淀粉质	0	4.27	0.026	0.29	1.4	72
	0.04	4.64	0.018	0.23	2.5	65
淀粉质+糖蜜	0	7.4	0.027	0.30	1.4	65
	0.04	8.05	0.017	0.23	2.6	55

(下转第210页)

This study demonstrates that the random walk model can fit the precipitation walk and recorded precipitation in city level. Together with our previous studies^[2,3], the random walk model provides another model to analyze the changes in both temperature and precipitation, and a piece of evidence that help to understand the true nature.

Acknowledgements

The authors wish to thank Dr Hong Zhang at Biyee SciTech Inc., MA, USA for helpful discussion.

References:

- [1] Yan S M, Wu G. Fitting of SSEC index (Shanghai Composite) from January 2000 to July 2010 using random walk model[J]. Guangxi Sci, 2011, 18: 92-96.
- [2] Yan S M, Wu G. Fitting of global temperature change from 1850 to 2009 using random walk [J]. Guangxi

Sci, 2010, 17(02):148-150.

- [3] Yan S M, Wu G. Application of random walk model to fit temperature in 46 gamma world cities from 1901 to 1998[J]. Natural Sci, 2010, 2: 1425-1431.
- [4] Wikimedia Foundation Inc. Wikipedia, the free encyclopedia[EB/OL]. [2010-2-28]. http://en.wikipedia.org/wiki/Global_city.
- [5] New M, Hulme M, Jones P. Representing twentieth-century space-time climate variability. Part II: Development of 1901-96 monthly grids of terrestrial surface climate[J]. Journal of Climate, 2000, 13: 2217-2238.
- [6] Willison S. Get Lat Lon[EB/OL]. [2010-2-28]. <http://www.getlatlon.com/>.
- [7] SPSS Inc. SigmaPlot for Windows Version 8. 02[CP], 2002.
- [8] Borovkov A, Borovkov K. Asymptotic analysis of random walks: heavy-tailed distributions[M]. Cambridge: University Press, 2008.

(责任编辑: 陈小玲)

(上接第 204 页)

3 结束语

本文通过对酒精发酵菌株 K6 生物学及其生理生化特性的研究, 发现菌株 K6 呈多种形态; 繁殖方式为芽殖, 有假菌丝, 无子囊孢子, 革兰氏染色为阴性; 能发酵葡萄糖、蔗糖、果糖、半乳糖、甘露糖、麦芽糖、木糖; 能同化葡萄糖、蔗糖、果糖、半乳糖、甘露糖、木糖、乳糖、可溶性淀粉(不定)、松三糖、山梨糖(不定); 氮源可以同化硫酸胺, 不能同化硝酸钾; 耐高渗透压; 产酯; 最适 pH 值为 4.0~4.5, 最适温度为 28~32℃。同源性分析显示菌株 K6 与假丝酵母属(*Candida*)的同源性达到 98%, 比对的 E 值最小, 分值最高, 发育关系非常接近, 这与生理生化鉴定结果相一致。假丝酵母属是酵母属中最大的一个属, 包括近 200 种, 在常规分类所测试的 30~40 项生理生化形状中, 许多种间往往只存在一两项区别^[6], 所以, 对其分类鉴定, 我们还应该进一步的深入研究。酒精发酵试验结果表明, 菌株 K6 能同时具有降低挥发酸, 缩短发酵时间, 提高产酒率, 增加

酒精产量的作用, 其中, 在淀粉质原料中的应用特别显著, 能缩短时间 7~10h, 酒精产量平均提高 8.8%。菌株 K6 能广泛应用于不同原料的酒精发酵生产中, 是酒精发酵行业技术发展的新突破。

参考文献:

- [1] 张纪忠. 微生物分类学[M]. 上海: 复旦大学出版社, 1990.
- [2] J A 巴尼特. 酵母菌的特性与鉴定手册[M]. 青岛: 青岛海洋出版社, 1984.
- [3] 周德庆. 微生物学实验手册[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1986.
- [4] J 萨母布鲁克, E F 弗里奇, T 曼尼阿蒂斯. 分子克隆实验指南[M]. 第 2 版. 北京: 科学出版社, 1992.
- [5] 胡嗣明. 酒精生产分析检验[M]. 北京: 轻工业出版社, 1983.
- [6] 刑来君, 李明春. 普通真菌学[M]. 北京: 高等教育出版社, 1999.

(责任编辑: 尹 闯)