

大湘西野生猕猴桃酿酒酵母的分离鉴定 及其产物 ACE 抑制活性

Isolation and identification of *Saccharomyces cerevisiae* of fermentation liquor of wild Kiwifruit from the Western of Hunan and the relative ACE inhibitory activity

伍 强^{1,2} 万 常¹ 彭娟娟¹ 曾 豪¹ 余有贵^{1,2}

WU Qiang^{1,2} WAN Chang¹ PENG Juan-juan¹ ZENG Hao¹ YU You-gui^{1,2}

(1. 邵阳学院食品与化学工程学院, 湖南 邵阳 422000; 2. 邵阳市酿酒工程技术研究中心, 湖南 邵阳 422000)

(1. College of Food and Chemical Engineering, Shaoyang University, Shaoyang, Hunan 422000, China;

2. Shaoyang Engineering Research Center of Wine, Shaoyang, Hunan 422000, China)

摘要:通过平板划线、显微镜观察、WL 培养基筛选、酒精度及血管紧张素转化酶(Angiotensin converting enzyme, ACE)抑制活性测定,对野生猕猴桃酿酒酵母进行分离筛选,再利用 26S rDNA D1/D2 区序列分析进行分子生物学鉴定。利用该菌株对野生猕猴桃进行纯种发酵,研究不同发酵阶段中发酵醪液的 ACE 抑制率、酒精度及多肽浓度变化。结果表明,经分离筛选获得适于猕猴桃果酒发酵的野生酵母 JM11 为酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*),在发酵 4 d 时发酵醪液的 ACE 抑制率为 $(93.0 \pm 2.6)\%$,酒精度为 $(7.8 \pm 0.5)\%$ Vol,多肽浓度为 $(2\ 652.0 \pm 112.4)\ \mu\text{g/mL}$,说明该菌株可酿制果酒,制得的产品还具有良好的 ACE 抑制活性,可作为野生猕猴桃降血压型保健果酒发酵的专用菌种或选育野生猕猴桃专用菌种的出发菌株。

关键词:野生猕猴桃;酿酒酵母;26S rDNA D1/D2;ACE 抑制活性

Abstract: The wild yeast JM11 was isolated from wild kiwifruits by lineation separating, screened by morphological characteristics in WL medium and microscope observation and further confirmed as *Saccharomyces cerevisiae* by 26S rDNA D1/D2 domain sequence analysis. The content of alcohol, peptide concentration and ACE (Angiotensin converting enzyme, ACE) inhibitory activity were determined during fermentation with pure *S. cerevisiae*. The kiwifruit juice fermented 4 d estimated the content of alcohol was $(7.8 \pm$

$0.5)\%$ Vol, ACE inhibitory activity was $(93.0 \pm 2.6)\%$ and peptide concentration was $(2\ 652.0 \pm 112.4)\ \mu\text{g/mL}$. Endogenous yeast strain was used for prepared the kiwifruit wine, which revealed high ACE inhibitory activity, and could be directly used for fermenting kiwifruit wine for hypertension or as the original strain for breeding new strain.

Keywords: wild kiwifruit; *Saccharomyces cerevisiae*; 26S rDNA D1/D2; ACE inhibitory activity

猕猴桃果酒除含一定乙醇外,还富含各种氨基酸、肽类及糖类、V_c等成分,具有预防心脑血管疾病、抗氧化、抗菌消炎等保健功效^[1],但该功效究竟与哪些活性成分有关,目前尚未得到表征。

ACE 抑制肽是一类具潜在降血压功效的小分子物质,具备安全高效、人体易吸收等优点。关于食物中本身存在的天然 ACE 抑制肽研究甚少,通常采用定向酶解技术制备食源性小肽^[2]。目前,已有研究发现利用微生物制成的发酵产品中含有活性较强的天然 ACE 抑制肽,其中 Kleekayai 等^[3]发现经传统自然发酵法制成的泰国虾酱中含有 2 种 ACE 抑制肽(Ser-Val 和 Ile-Phe);Wang 等^[4]利用纳豆芽孢杆菌发酵豆粕获得 ACE 抑制肽,测得其活性 IC_{50} 为 $22\ \mu\text{g/mL}$;Nejati 等^[5]接种乳酸乳球菌 DIBCA2 制成发酵乳,获得 IC_{50} 为 $5\ \mu\text{g/mL}$ 的 ACE 抑制肽;Wang 等^[6]发现经霉菌发酵生产的豆豉中富含 ACE 抑制肽,并指出霉菌发酵过程中发生的美拉德反应影响 ACE 抑制活性,目前国内外未见果酒 ACE 抑制肽的研究报道。

本研究拟以大湘西野生猕猴桃为菌种分离源,通过分离筛选和分子生物学鉴定,旨在获得一株适用于猕猴桃果酒发酵的优势野生酵母菌,并初步研究该菌株纯种发酵过程中 ACE 抑制活性、多肽浓度及酒精度的动态变化,为开发大湘

基金项目:湖南省科技厅重点研发计划项目(编号:2016NK2082);湖南省自然科学基金项目(编号:2016JJ4080);湖南省大学生研究性学习和创新性实验计划项目(编号:2016[96]-591,2017[205]-644)

作者简介:伍强,女,邵阳学院助教,硕士。
通信作者:余有贵(1964—),男,邵阳学院教授,博士。
E-mail: yufly225@163.com

收稿日期:2018-03-04

西野生猕猴桃降血压型保健果酒提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

酵母菌分离源:湖南邵阳绥宁野生猕猴桃;
对照菌株:安琪果酒酵母,安琪酵母股份有限公司;
酵母 26S rRNA 基因 D1/D2 区序列扩增引物 NL-1(5'-GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAAG-3')、NL-4 (5'-GGTCCGTGTTTCAAGACGG-3');北京六合华大基因有限公司;
CTAB、TE、蛋白酶 K、PCR 缓冲液、dNTP、TaqDNA 聚合酶:北京宝杰罗生物科技有限公司;
果胶酶:酶活 50 000 U/g,河南华悦化工产品有限公司;
培养基所有试剂均为分析纯。

1.2 培养基

分离培养基:YEPD 培养基^[7];
WL 培养基:葡萄糖 50 g,溴甲酚绿 0.022 g,磷酸二氢钾 0.55 g,胰蛋白胨 5.0 g,氯化钾 0.425 g,酵母浸粉 4.0 g,硫酸镁 0.125 g,硫酸锰 0.002 5 g,氯化铁 0.002 5 g,氯化钙 0.125 g,琼脂 20.0 g,用蒸馏水定容至 1 L,pH 为 6.5,高温 121 ℃灭菌 20 min^[8];
猕猴桃培养基:选八成熟、发软的野生猕猴桃,清洗干净,打浆,加入 0.10 g/100 g 果胶酶搅拌均匀,在 35 ℃酶解 3 h,取上清液于 68 ℃灭菌 20 min。

1.3 主要仪器设备

单人单面垂直净化工作台:SW-CJ-1FD 型,苏州博莱尔净化设备有限公司;
数码显微镜:BA310 型,麦克奥迪(厦门)实业集团有限公司;
打浆机:JYL-C012 型,九阳股份有限公司;
pH 计:EL20 型,梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司;
紫外可见分光光度计:UV-1780 型,日本岛津仪器有限公司;
高压灭菌锅:JI54DWS 型,致微(厦门)仪器有限公司。

1.4 方法

1.4.1 酵母菌的分离 根据柴洋洋等^[9]的方法修改如下:无菌称取 10 g 新鲜的野生猕猴桃,置于无菌研钵中研成果浆,转移至装有 90 mL 无菌水的三角瓶,混合均匀后置于 28 ℃培养 24 h。以无菌水对该浆液进行梯度稀释,吸取 10⁻¹ 稀释液 2 μL 涂布于 YEPD 分离培养基上,于 28 ℃培养 3 d。挑选典型的酵母单菌落平板划线,继代 2 次获得纯化菌种,用 JM1、JM2、JM3、……依次编号,观察菌落形态特征。
1.4.2 酿酒酵母的筛选 挑选 YEPD 分离培养基上具有单菌落、表面光滑突起、呈奶油色的菌株,在 10×80 倍显微镜下镜检,观察细胞的形态特征,对多端出芽繁殖的酵母菌株进行初筛。

采用 WL 培养基从初筛的酵母菌株中筛选出酿酒酵母^[8],将酵母菌株分别划线接种于 WL 培养基,28 ℃培养 5 d 后,选择颜色为乳白色、球形突起、表面光滑不透明、平板上有酒香的菌株。

将筛选的酿酒酵母活化后,以 3 mL/100 mL 接种量(种子液浓度 1.0×10⁸ 个/mL)接种于猕猴桃培养基上,调整起始 pH 为 3.6,起始糖度 160 g/L,于 28 ℃发酵 72 h,测定发酵醪液的 ACE 抑制活性及酒精度,以安琪果酒酵母作为对照,筛选出发酵能力较强并具有 ACE 抑制活性的酿酒酵母。
1.4.3 酵母菌的分子生物学鉴定 根据牛广财等^[10]的方法修改如下:取纯化菌株于研钵中液氮研磨,加入 600 μL TE 充分悬浮菌体,加入 10% SDS 250 μL,倒转混匀后加入 20 ng/μL 蛋白酶 K 3 μL,于 37 ℃水浴 1 h。依次加入 5 mol/L NaCl 150 μL、2% CTAB 150 μL,于 65 ℃水浴 20 min。12 000 r/min 离心 20 min,取上清液加入等体积异丙醇,放置 30 min。12 000 r/min、4 ℃离心 10 min,取沉淀加入 70%酒精 750 μL,充分悬浮后 12 000 r/min、4 ℃离心 2 min,取沉淀加入 30 μL(含 Rnase,10 ng/μL),4 ℃溶解过夜。PCR 扩增条件:95 ℃ 30 s,55 ℃ 30 s,70 ℃ 1 min,35 个循环;72 ℃ 10 min。反应体系(30 μL):Taq 聚合酶(5 U/L)0.2 μL,PCR 缓冲液 3 μL,dNTP 混合液(25 mmol/L)2 μL,引物 NL-1(10 mol/L)3 μL,引物 NL-4(10 mol/L)3 μL,模板 DNA 1 μL,ddH₂O 定容至 30 μL。将 PCR 产物送至北京六合华大基因有限公司进行 26S rDNA D1/D2 测序,在 GenBank 核酸序列数据库中进行同源序列比对(BLAST)。

1.4.4 发酵醪液的 ACE 抑制活性 将分离筛选获得的酿酒酵母接种于猕猴桃培养基,调整起始糖度为 160 g/L,起始 pH 为 3.6,在 28 ℃下进行纯种发酵。分别在不同发酵阶段(0,2,4,6,8,10 d)取 100 mL 发酵醪液,根据余有贵等^[11]的方法,采用密度仪测定其酒精度。4 000 r/min 离心 15 min,测定发酵醪液上清液的 ACE 抑制率和多肽浓度。

1.4.5 ACE 抑制率的测定 参照 Wu 等^[12]的方法。

1.4.6 多肽浓度的测定 根据 Wu 等^[13]的方法修改如下:将发酵醪液上清液与 10 g/100 mL 的三氯乙酸(TCA)水溶液等体积混合后静置 10 min,在 4 000 r/min 下离心 15 min,取上清液用福林—酚法测定吸光值,计算多肽浓度。

2 结果与分析

2.1 酵母菌的分离纯化与筛选

经初步分离,获得 12 株符合条件的酵母菌菌株,分别标记为 JM1~JM12。如表 1 所示,通过菌落形态观察和细胞形态镜检,发现 JM1、JM2、JM3、JM4、JM5、JM6、JM11、JM12 菌落均呈白色,显微镜下观察细胞多呈圆形、椭圆形,其中 JM1、JM11、JM12 菌落较大、呈奶白色、表面光滑突起[图 1(a)],细胞呈圆形[图 1(b)]。利用 WL 培养基对 8 株菌株作进一步筛选,发现其菌落形态差异明显,JM1、JM11、JM12 菌落呈乳白色、球形突起、表面光滑不透明[图 1(c)],平板上有酒香,将其初步拟定为酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*);JM2、JM3 菌落中央呈深绿色、边缘呈淡绿色,扁平、表面光滑不透明,呈黄油状,属于葡萄汁有孢汉逊酵母(*Hanseniaspora uvarum*);JM4、JM5、JM6 菌落呈鲜绿色,菌落很小、表面光滑不透明、呈黄油状,属于粟酒裂殖酵母(*Schizosaccharomyces pombe*)。

表 1 野生猕猴桃酵母菌的分离筛选
Table 1 Isolation and screening of yeast strains from wild kiwifruit

菌株编号	YEPD	WL	镜检	初步鉴定
JM2、JM3	白色，表面湿润光滑，稍透明，菌落小	中央深绿色，边缘浅绿色，扁平、表面光滑不透明	椭圆形	葡萄汁有孢汉逊酵母
JM4、JM5、JM6	白色，表面光滑不透明，菌落小，较平坦	鲜绿色，菌落很小，表面光滑不透明，呈黄油状	圆形	粟酒裂殖酵母
JM7、JM8	粉红色，表面湿润黏稠，菌落较大	红色，表面光滑黏稠，呈黄油状，球形突起	椭圆形	红酵母
JM9、JM10	红棕色，表面黏稠，菌落突起	红棕色，菌落小，表面光滑不透明，球形突起	椭圆形	全美梅氏酵母
JM1、JM11、JM12	奶白色，表面湿润光滑，菌落较大	乳白色，平板上有酒香，表面湿润光滑，球形突起	椭圆形	酿酒酵母

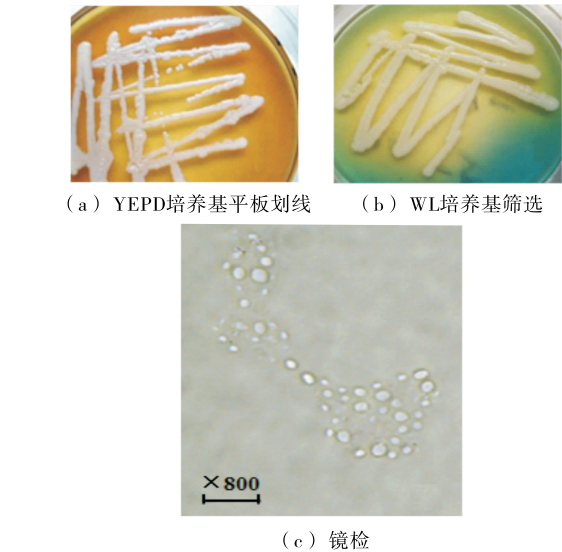


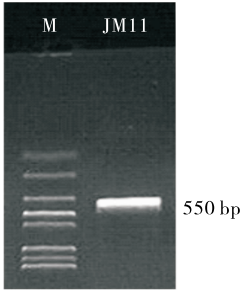
图 1 野生猕猴桃酿酒酵母菌 JM11 的形态特征
Figure 1 Morphological characteristics of *Saccharomyces cerevisiae* JM11 from wild kiwifruit

选取 JM1、JM11、JM12 对猕猴桃培养基进行发酵，比较三者的产酒量及 ACE 抑制活性，发现 JM11 发酵醪液的酒精度最高(5.6% Vol)，ACE 抑制率较强(69.4%)。对 JM11 作进一步分子生物学鉴定，以验证该野生酵母菌为酿酒酵母。

2.2 酿酒酵母的分子生物学鉴定

利用引物 NL-1 与 NL-4 对该酿酒酵母 26S rDNA 基因序列进行 PCR 扩增，如图 2 所示，琼脂糖凝胶电泳显示该扩增产物的分子量约为 550 bp。

野生猕猴桃酵母菌 JM11 的 DNA 测序结果如图 3 所示，将该序列提交至 GenBank 核酸序列数据库进行序列比



对,发现该菌株与 *Saccharomyces cerevisiae* (MG547774.1) 序列相似性最高,为 90%。结合该菌株的 YEPD 培养基、WL 培养基等菌落特征和显微镜细胞形态观察,确定所筛选的野生猕猴桃酵母菌 JM11 属于酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)。
Figure 2 Electrophoretogram of PCR product of *Saccharomyces cerevisiae* JM11 from wild kiwifruit

对,发现该菌株与 *Saccharomyces cerevisiae* (MG547774.1) 序列相似性最高,为 90%。结合该菌株的 YEPD 培养基、WL 培养基等菌落特征和显微镜细胞形态观察,确定所筛选的野生猕猴桃酵母菌 JM11 属于酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)。

2.3 酿酒酵母发酵醪液的 ACE 抑制活性

如图 4 所示,随着野生猕猴桃酿酒酵母纯种发酵的进行,该发酵醪液中多肽浓度呈先上升后下降的趋势,ACE 抑制率则先上升后趋于平缓。酒精度不断上升,尽管在第 6 天时酒精度高达 9.5% Vol,但在发酵第 4 天时,ACE 抑制率由发酵前的 32.6% 上升至 93.0%,多肽浓度也达到最高值(2 652.0 μg/mL),说明在野生猕猴桃经自然发酵后产生了活性较强的 ACE 抑制剂,其活性高于箭鱼鱼卵^[14]、墨鱼^[15]、鸭皮^[16]等食源性 ACE 抑制剂。

真菌在生长过程中可分泌蛋白酶,将蛋白质降解为氨基酸或短肽^[17]。酵母为适应环境变化,胞内会出现应激蛋白,与此同时也会分泌胞外蛋白作为一种信号载体或分泌蛋白

```
1  GGGGGGACTG  CGGAAGGATC  ATTACAGTAT  TCTTTTGCCA  GCGCTTAATT  GCGCGGCGAA
61  AAACCTTACA  CACTATGTTT  TTTTAATTG  AAACCTTATG  TTTGCTCTGG  CTTAGAAATA
121 GGTGCGGCCA  AAGGTTTAT  CAAAACCTCA  ATATTTATTA  TTGAATTGTT  ATTTTAATTT
181 TATTGTCAAT  TTGTTGATTA  ATATCAAAAA  TCTTCAAAAC  TTCAACAAC  GGACTCTTTG
241 GTTCTCGCAT  CGATGAAGAA  CGCAGCGAAA  TCGGATAAGT  AATATGAAAT  GCAGATTTTC
301 GTGAATCATC  GAATCTTTGA  ACGCACATTG  CGCCCTTTGG  TATTCCAAAG  GGCATGCCTG
361 TTTGAGCGTC  ATTTCTCTCT  CAAATCTTCG  GATTTGGTTT  TGAGTGATAC  TCTTAGTCAG
421 ACTAAGCGTT  TGCTTGAAAT  GTATTGGCAT  GAGTGGTACT  AGATAGTGCT  GAAGCTTTTT
481 CAATGTATTA  GGTATCCA  ACTCGTTGAC  TCGGCCTTAC  AACAACAAAC  AAAGTTTGAC
541 CTCAAATCAG  GTAGGACTAC
```

图 3 野生猕猴桃酵母菌 JM11 基因序列
Figure 3 Nucleotide sequence of yeas JM11 from kiwifruit

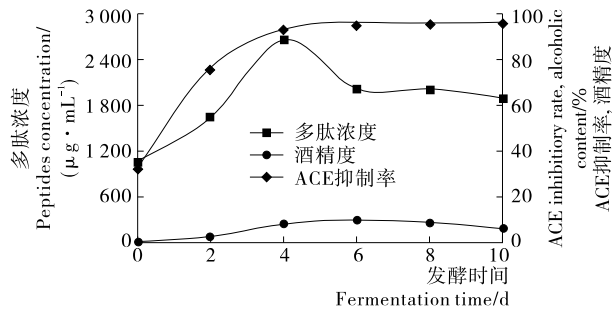


图 4 野生猕猴桃不同发酵阶段醪液中 ACE 抑制活性的测定

Figure 4 Determination of ACE inhibitory activity of wine fermentation liquor of wild kiwifruit

酶来应对环境的变化^[18],酿酒酵母^[19]和纯生啤酒酵母^[20]在特定发酵条件下可分泌蛋白酶 A 酶原、蛋白酶 A。因此,本研究推测在该发酵过程中野生酵母菌分泌蛋白酶,降解猕猴桃果肉蛋白,从而产生 ACE 抑制活性较强的肽类物质。为证实推测,后期课题组将进一步对发酵醪液中可能存在的 ACE 抑制肽进行分离纯化,并研究该活性肽在野生猕猴桃纯种发酵过程中的形成机理。

3 结论

利用平板划线、YEPD 培养基、WL 培养基及显微镜观察对野生猕猴桃酵母菌进行分离筛选及初步鉴定,发现野生猕猴桃酵母菌共有酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*)、葡萄汁有孢汉逊酵母 (*Hanseniaspora uvarum*)、路氏类酵母 (*Saccharomycordes ludwoggi*)、红酵母 (*Rhodotorular*)、全美梅氏酵母 (*Metschnikowia pulcherrima*) 5 类,分别编号为 JM1~JM12,其中 JM1、JM11、JM12 被鉴定为酿酒酵母。利用 ACE 抑制活性、酒精度等指标对酵母菌 JM1、JM11、JM12 作进一步筛选,发现 JM11 发酵醪液表现出较强的 ACE 抑制活性,并测得酒精度为 5.6% Vol,经 26S rDNA D1/D2 区序列分析,确定野生猕猴桃酵母菌 JM11 为酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*)。利用酵母菌 JM11 对野生猕猴桃进行纯种发酵,发现该发酵过程中产生了活性较强的 ACE 抑制剂,该物质是否为 ACE 抑制肽,仍有待进一步确认。

参考文献

[1] 蒋本庆,高铭坤.果酒的保健功效及蓝莓果酒发展分析研究[J].酿酒,2015,42(2):115-118.

[2] ZHONG Chan, SUN Le-chang, YAN Long-jie, et al. Production, optimisation and characterisation of angiotensin converting enzyme inhibitory peptides from sea cucumber (*Stichopus japonicus*) gonad[J]. Food & Function, 2017, 9(1): 594-603.

[3] KLEEKAYAI T, HARNEDY P A, O'KEEFFE M B, et al. Extraction of antioxidant and ACE inhibitory peptides from Thai traditional fermented shrimp pastes[J]. Food Chemistry, 2015, 176: 441-447.

[4] WANG Hai-kuan, ZHANG Shan-ting, SUN Yan, et al. ACE-Inhibitory peptide isolated from fermented soybean meal as functional food[J]. International Journal of Food Engineering, 2014, 9(1): 1-8.

[5] NEJATI F, RIZZELLO C G, CAGNO R, et al. Manufacture of a functional fermented milk enriched of angiotensin-I converting enzyme (ACE)-inhibitory peptides and γ -amino butyric acid (GABA) [J]. LWT-Food Science and Technology, 2013, 51(1): 183-189.

[6] WANG Hui, LI Yong-yu, CHENG Yong-qiang, et al. Effect of the maillard reaction on angiotensin I-converting enzyme (ACE)-inhibitory activity of Douchi during fermentation[J]. Food and Bioprocess Technology, 2013, 6(1): 297-301.

[7] 叶菁,岳希洁,蒋雪薇,等.酿酒酵母低敏感突变株的选育[J].食品与机械,2017,33(8):23-26.

[8] 程雷,李梓,王军.葡萄自然发酵过程中酵母菌的研究[J].中国食品学报,2010,10(2):131-137.

[9] 柴洋洋,葛菁萍,宋刚,等.传统发酵豆酱中酵母菌的分离、筛选及功能酵母的鉴定[J].中国食品学报,2013,13(3):183-188.

[10] 牛广财,朱丹,王军,等.沙棘果酒优良酵母菌的筛选及分子生物学鉴定[J].中国食品学报,2009,9(6):60-65.

[11] 余有贵,张文武,曹乐,等.老化窖池与常规窖池的窖泥特性与发酵性能比较[J].食品与机械,2015,31(1):2-5.

[12] WU Qiang, CAI Qiu-feng, TAO Zhi-peng, et al. Purification and characterization of a novel angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptide derived from abalone (*Haliotis discus hannai Ino*) gonads [J]. European Food Research and Technology, 2015, 240: 137-145.

[13] WU Qiang, CAI Qiu-feng, ASAMI Y, et al. Purification and characterization of two novel angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides derived from R-phycoerythrin[J]. European Food Research and Technology, 2017, 243(5): 1-11.

[14] INTARASIRISAWAT R, BENJAKUL S, WU Jian-ping, et al. Isolation of antioxidative and ACE inhibitory peptides from protein hydrolysate of skipjack (*Katsuwana pelamis*) roe[J]. Journal of Functional Foods, 2013, 5(4): 1 854-1 862.

[15] BALTI R, NEDJAR-ARROUME N, BOUGATEF A, et al. Three novel angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibitory peptides from cuttlefish (*Sepia officinalis*) using digestive proteases[J]. Food Research International, 2010, 43(4): 1 136-1 143.

[16] LEE S J, KIM Y, KIM S, et al. Purification and Characterization of a Novel Angiotensin I-Converting Enzyme Inhibitory Peptide Derived from an Enzymatic Hydrolysate of Duck Skin Byproducts[J]. Journal of Agricultural & Food Chemistry, 2012, 60(40): 10 035-10 040.

[17] 蒋盛岩,阳亚男,李艺琪,等.灵芝菌液态发酵富硒大豆过程中酶活性的研究[J].邵阳学院学报:自然科学版,2011,8(4):48-51.

[18] LAURA S, MARJO P, PITK J, et al. Proteome analysis of recombinant xylose-fermenting *Saccharomyces cerevisiae* [J]. Yeast, 2003, 20(4): 295-314.

[19] DONG Liang, LI Feng, PIAO Yong-zhe, et al. Characterization of proteinase A excretion from *Saccharomyces cerevisiae*, in high sugar stress conditions [J]. Applied Biological Chemistry, 2015, 58(2): 203-208.

[20] LEISEGANG R, STAHL U. Degradation of a foam-promoting barley protein by a proteinase from brewing yeast[J]. Journal of the Institute of Brewing, 2005, 2: 112-117.