DOI:10.13652/j.issn.1003-5788.2017.05.001

降柠檬酸菌株的筛选及鉴定

Study on isolation and identification of reducing citric acid strains

张 铎[1,2,3] 毛 勇[4] 毛 健[1,2,3,5,6] 刘双平[1,2,3,5,6] 周志磊[1,2,3,5,6]

ZHANG Duo[1,2,3] *MAO Yong*[4] *MAO Jian*[1,2,3,5,6] *LIU Shuang-ping*[1,2,3,5,6] *ZHOU Zhi-lei*[1,2,3,5,6]

(1. 江南大学粮食发酵工艺与技术国家工程实验室,江苏 无锡 214122;2. 江南大学食品学院,江苏 无锡 214122;
3. 江南大学食品安全与营养协同创新中心,江苏 无锡 214122;4. 中国酒业协会,北京 100831;
5. 国家黄酒工程技术研究中心,浙江 绍兴 312000;6. 江南大学〔如皋〕食品生物技术研究所,江苏 如皋 226500)

(1. *National Engineering Laboratory for Cereal Fermentation Technology*, *Jiangnan University*, *Wuxi*, *Jiangsu* 214122, *China*; 2. *School of Food Science and Technology*, *Jiangnan University*, *Wuxi*, *Jiangsu* 214122, *China*; 3. *Synergetic Innovation Center of Food Safety and Nutrition*, *Jiangnan University*, *Wuxi*, *Jiangsu* 214122, *China*; 4. *China Alcoholic Drinks Association*, *Beijing* 100831, *China*; 5. *National Engineering Research Center of Chinese Rice Wine*, *Shaoxing*, *Zhejiang* 312000, *China*; 6. *Jiangnan University and Rugao Institute of Food Technology*, *Rugao*, *Jiangsu* 225004, *China*)

摘要:为筛选具有降柠檬酸能力的酵母菌株,对一柠檬酸厂废水废渣中的微生物进行培养分离纯化保藏,共获得具有耐柠檬酸的菌株 15 株。对 15 株菌株的降柠檬酸能力进行测试,发现 5 株菌的降柠檬酸能力较强,发酵 5 d 可降解柠檬酸培养基中 70%以上的柠檬酸。测定 5 株菌的酒精耐受性,菌株 NS2、NL2 的酒精耐受能力较强。观察该两株菌的形态学及生理生化特性,将 NS2 鉴定为毕赤酵母菌,NL2 鉴定为热带假丝酵母菌。进一步通过分子生物手段进行 18S rDNA PCR 测序分析,将 NS2 鉴定为 *Pichia kudriavzevii*,NL2 鉴定为 *Candida tropicalis*。研究成果可为今后应用生物降酸法降低山楂酒等果酒中有机酸含量提供指导。

关键词:酵母菌;降酸;毕赤酵母菌;筛选;测序;鉴定

Abstract: In order to screen the strains which have the capability of reducing the citric acid, 15 strains of yeasts were isolated from the materials of waste water and waste residue. The waste water and residue were collected in the citric acid factory. The yeasts were screened based on the capability of fermenting the citric acid. It was found that the 5 strains had good capability of reducing the citric acid. They could reduce at least 70% citric acid of the culture medium after 5 d fermentation. The 5 strains were tested the stress resistance of ethanol. The strain NS2 and NL2 have strong stress resistance. The morphological and physiology characteristics of NS2 and NL2 were measured by microscopic observation, assimilation of carbon and nitrogen. Then the two strains were identified by 18S rDNA sequencing and the phylogenetic analysis. In the end, NS2 was identified as *Pichia kudriavzevii*, NL2 was identified as *Candida tropicalis*. They can be used in the technology of acid reduction in the hawthorn wine in the future.

Keywords: Yeast; Acid Reduction; *Pichia*; Screen; Sequencing; Identification

山楂(*Crataegus pinnatifida Bunge*)属蔷薇科山楂属,又名山里果、山里红,是中国北方地区重要的栽培水果[1]。由于其丰富的营养价值和酸甜可口的风味特点,山楂也常用于酿造果酒。酸度是果酒的酿造过程中的重要指标之一,适量的有机酸有助于丰富果酒风味,营造出清爽可口的口感,同时降低酒体中的 pH,起到抑制杂菌生长的作用。但有机酸含量过高则会产生酒体酸涩,难以入口等[2]。发酵型果酒的有机酸主要来自于发酵原料,研究[3]发现不同种类果酒中所含有机酸不同,主要为酒石酸、苹果酸和柠檬酸。葡萄酒中的有机酸主要为酒石酸[4],苹果酒中富含大量苹果酸[5],而山楂酒、橙酒等果酒中的有机酸主要为柠檬酸[6]。目前传统的果酒降酸方法主要分为物理降酸法如离子交换树降酸法[7]、电渗析降酸法[8-9]、低温冷冻降酸法等和化学降酸法[10],以及生物降酸法[11]等。这些降酸方法各有优劣,有研究[12]表明冷冻降酸法不添加其他物质,对葡萄酒原有的风味营养影响较小,但降酸幅度较小,一般可以降低葡萄酒中 0.5~2.0 g/L 的酒石酸。有报道[13]采用电渗析降酸法对杨梅果酒进行降酸处理,可以降低约 42%的可滴定酸,但其是

基金项目:国家自然科学基金-面上项目(编号:31571823);江苏省自然科学基金-面上研究项目(编号:BK20161293);2015 年度区科技重点研发计划项目(镇江市丹徒区,编号:NY2015009)

作者简介:张铎,男,江南大学在读硕士研究生。

通信作者:毛健(1970—),男,江南大学教授,博士研究生导师,博士。E-mail:maojian@jiangnan.edu.cn

收稿日期:2017—03—10

一个连续的降酸过程，动力消耗大，成本高。化学降酸法的原理是利用偏碱性盐与酒体中的有机酸反应从而达到降酸目的，常用的降酸剂有 Na_2CO_3、K_2CO_3、$KHCO_3$ 等，其降酸效果较为明显[14]。但由于引入了化学添加剂，会导致果酒酒体浑浊，产生苦涩口味等不利影响。生物降酸法中最常见的为苹果酸—乳酸发酵，这种方法普遍应用于葡萄酒的后酵阶段[15]，不仅能显著降低酸度，还可以改善酒体风味，提升葡萄酒的品质[16]。山楂酒中的柠檬酸含量过高，亟需解决，目前山楂酒的化学降酸法研究报道较多，而利用生物降酸法降低柠檬酸含量的研究报道相对较少，王立芳等[17]研究获得一株陆生伊萨酵母(*Isstchenkia terricola*)，在苹果酸和柠檬酸为唯一碳源的培养基中可降解 79.9% 的苹果酸和 73.1% 的柠檬酸，但未继续探究菌株在果酒中的实际降酸效果。由于生物降酸避免了化学试剂的加入，在显著降低酸度的同时还可以部分改善果酒品质，符合消费者追求天然的、无添加剂的消费心理。本研究拟通过以柠檬酸为唯一碳源的培养基培养筛选可降解柠檬酸的菌株，旨在今后可以应用于发酵山楂酒降酸工艺。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

1.1.1 材料与试剂

柠檬酸废水废渣样品：取自江苏省宜兴市一柠檬酸厂；

dNTP、琼脂糖等分子生物试剂：加拿大 BBI 公司；

其他试剂为国产分析纯；

YPD 培养基：20 g 葡萄糖，20 g 鱼粉蛋白胨，20 g 酵母提取物，自然 pH，溶于 1 L 蒸馏水中；

WL 培养基：酵母提取物 4 g，胰蛋白胨 5 g，葡萄糖50 g，磷酸氢二钾 0.55 g，氯化钾 0.425 g，氯化钙 0.125 g，硫酸镁 0.125 g，氯化铁 0.002 5 g，硫酸锰 0.002 5 g，溴甲酚绿 0.022 g，pH 6.5，溶于 1 L 蒸馏水中；

柠檬酸液体培养基：酵母提取物 2.5 g，鱼粉蛋白胨 2.5 g，磷酸二氢钾 0.55 g，氯化钙 0.125 g，硫酸镁 0.125 g，硫酸锰 0.002 5 g，柠檬酸 12 g，pH 2.8，溶于 1 L 蒸馏水中。固体培养基则在上述配方基础上加入 20 g/L 的琼脂，121 ℃高压灭菌 20 min[18]。

1.1.2 主要仪器设备

台式高速冷冻离心机：5810R 型，德国 Eppendorf 公司；

恒温水浴锅：HH-S2 型，江苏金坛市环宇科学仪器厂；

pH 计：FE20k 型，梅特勒-托利多仪器有限公司；

鼓风干燥箱：DGG-9240B 型，上海森信实验仪器有限公司；

电子天平：EL3002 型，梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司；

立式压力蒸气灭菌锅：YXQ-LS-50SII 型，上海博迅实业有限公司；

PCR 仪：ProFlex 型，美国 Life 公司；

电泳仪：DYY-6C 型，北京六一仪器厂；

凝胶成像仪：Gel Doc XR 型，美国伯乐公司；

紫外分光光度计：UV-2100 型，尤尼科(上海)仪器有限公司。

1.2 方法

1.2.1 菌株的分离纯化

(1) 采样富集培养：从柠檬酸厂生产过程中采集废渣样品 4 份分别记为 S1、S2、S3、S4，废水样品 4 份，分别记为 L1、L2、L3、L4。取 4 份废渣样品各 1 g，分别接入 50 mL YPD 培养基中，吸取废水样品各 1 mL，分别接入 50 mL YPD 培养基中，放置于恒温摇床中培养 48 h，培养条件30 ℃，摇床转速 150 r/min。

(2) 柠檬酸培养基筛选培养：若菌株具有降解柠檬酸的能力，其在柠檬酸培养基中必定可以生长，吸取富集培养液 2 mL，分别接种于 50 mL 柠檬酸培养基，放置于恒温摇床培养 48 h，培养条件 30 ℃，摇床转速 150 r/min。

(3) 菌株的分离纯化培养：将 8 个锥形瓶中的菌液分别进行梯度稀释后涂布于 WL 平板培养基上，梯度稀释的比例分别为 10^{-3}，10^{-4}，10^{-5}，10^{-6}，10^{-7}。置于恒温培养箱中培养，培养条件 30 ℃，48 h。挑取培养基上疑似酵母菌的菌株划线接种于平板培养基中，继续挑取单菌落重复平板划线培养。

1.2.2 菌株保藏 将菌株平板划线纯化培养 2 代后，挑取单菌落接入 50 mL YPD 液体培养基中，恒温摇床培养 36 h，静置 10 min，移液枪吸取 1 mL 培养基底部较浓菌液于规格为 2 mL 的甘油保藏管中，再加入已灭菌的 30% 甘油 1 mL，旋紧管盖后振荡混匀，注明菌株名称和保藏日期，置于菌种保藏盒，上述操作均在超净台无菌完成。将菌种保藏盒放入 −80 ℃超低温冰箱保藏。

1.2.3 降柠檬酸菌株筛选

(1) 菌株降柠檬酸能力试验：活化菌株接种于柠檬酸液体培养基，置于恒温培养箱中培养，培养条件 30 ℃，培养时间 5 d，培养结束后测定柠檬酸浓度，比较菌株降解柠檬酸能力。测定方法采用滴定法，以柠檬酸计。

(2) 菌株酒精耐受性试验：将活化好的种子液以 4% 的接种量接种于 50 mL 含有 5 g/L 柠檬酸的 YPD 液体培养基中，分别加入无水乙醇，调整初始酒精体积分数为 0%～10%，30 ℃培养 5 d，利用紫外分光光度计在 600 nm 波长处测定吸光度，每组做 3 个平行样。

1.2.4 菌株形态学鉴定 对酵母菌进行平板培养及镜检，观察菌株形态学特征。

(1) 菌落培养特征：将菌株活化后挑取单菌落划线接种于 YPD 平板培养基，置于恒温培养箱中培养，培养条件 30 ℃，培养时间 2～3 d，观察平板培养基上菌落形态。

(2) 液体培养基培养特征：将菌株活化后挑取单菌落接种于 50 mL YPD 液体培养基，置于恒温摇床培养，培养温度 30 ℃，摇床转速 150 r/min，培养时间 2～3 d，观察液体培养基中菌体培养状态。

(3) 细胞镜检：使用显微镜观察 40×10 倍下细胞形态。

1.2.5 菌株生理生化鉴定

(1) 糖发酵试验：鉴定所需发酵的碳源为葡萄糖、麦芽

糖、乳糖、蔗糖、*D*-半乳糖。分别将碳源加入含有杜氏发酵管的氮源基础培养基中,添加量为 0.5%,过滤除菌(0.20 μm)。活化菌株 NS2 后分别接入不同碳源培养基中,放置于恒温培养箱中培养,培养温度 25 ℃,每 2 d 观察一次,连续观察 2 周,于 4 周后再次观察。主要观察杜氏小管中是否产生气体从而判断能否发酵该种碳源,若有气泡则记为阳性,若无气泡则记为阴性,每种碳源做 3 次重复[19]19[20]15。

(2) 碳源同化试验:葡萄糖、乳糖、蔗糖、*D*-半乳糖、可溶性淀粉、麦芽糖、甘油、甲醇、乙醇、肌醇、甘露醇、柠檬酸、琥珀酸 15 种碳源。分别将碳源加入氮源基础培养基中,添加量 0.5%,另取一不添加碳源的基础培养基作为对照,过滤除菌(0.20 μm)。在 YPD 液体培养基中活化菌株 NS2,取灭菌离心管,倒入培养液离心获得菌沉淀,离心条件 10 000×g,5 min。以无菌水洗涤沉淀,重复 2 次,加入无菌水制得菌悬液。将菌悬液接种于上述培养基中,接种量 5%,置于恒温培养箱中培养 3 周,培养温度 25 ℃。每周观察一次,将试管振荡均匀仔细观察菌液是否浑浊,若浑浊则记为阳性,若澄清则记为阴性[19]18[20]15。

(3) 氮源同化试验:鉴定为硝酸钾、硝酸钠、硝酸铵、尿素,试验操作与碳源同化试验相同,因为 pH 值小于 6 时形成的亚硝酸对酵母存在毒性,因此调节初始 pH 至 6.5[19]19[20]15−16。

1.2.6　菌株分子生物鉴定

(1) 菌株 DNA 提取:吸取 1.5 mL 菌液于 2 mL EP 管中,10 000×g 离心 10 min;收集沉淀,加 2 mL ddH_2O 混悬均匀;10 000×g 离心 2 min,得菌沉淀,重复 1 次。用细胞破碎仪破碎,每破碎 15 s 后将 EP 管置于冰水浴 60 s,重复 5 次。加 1.5 mL ddH_2O 混悬均匀,10 000×g 离心 10 min,得菌沉淀。菌沉淀中加入 0.5 mL DNA 抽提液(100 mmol/L Tris-HCl pH 8.0,100 mmol/L EDTA,pH 8.0,100 mmol/L Na_3PO_4,1.5 mol/L NaCl)混悬,37 ℃条件下静置 30 min;加入 125 μL 10% SDS 后,立即加入 5 μL 蛋白酶 K(浓度为 20 mg/mL),混均后 65 ℃水浴 1 h,每隔 15 min 上下颠倒混均样品;加入 700 μL CTAB 缓冲液,混均后 65 ℃水浴 1 h,每隔 15 min 上下颠倒混均样品。

所得样品用等体积的氯仿—异戊醇(体积比 24∶1)混均后于 4 ℃条件下,12 000×g 离心 10 min,抽提 2～3 次;以 0.6 倍体积的异丙醇于−20 ℃沉淀 1 h;4 ℃,12 000×g 离心 10 min,收集核酸沉淀;加入 1 mL 70%的乙醇于 4 ℃条件下,12 000×g 离心 10 min,洗涤沉淀 2～3 次,倒扣去除过量水分,于 37 ℃干燥 DNA 约 5 min;加 50 μL ddH_2O 溶解沉淀,加入终浓度为 0.5 μL/mL 的 RNA 酶,并在 37 ℃下水浴消化 30～60 min,以去除 RNA;得到的 DNA 样品置于−20 ℃ 冰箱保存备用。

(2) PCR 检测方法:将得到的菌株 DNA 进行 Touch down PCR 扩增,对菌株的 18S rDNA 区进行 PCR 扩增,真菌采用张霞等[21]在相关研究中所使用的通用引物,上游引物为 NS1:5'-GTAGTCATATGCTTGTCTC-3',下游引物为 NS8:5'-TCCGCAGGTTCACCTACGCGA-3',扩增的片段大小约为 1 700 bp。PCR 体系为(50 μL):Taq PCR master mix 25 μL,上下引物各 0.5 μL,模板 2.5 μL,补无菌水至 50 μL。相应 PCR 反应条件为:95 ℃预变性 5 min;94 ℃变性 30 s,60 ℃退火 30 s,72 ℃延伸 2 min(Touch down PCR,10 个循环,每个循环降低 1 ℃);94 ℃变性 30 s,58 ℃退火 30 s,72 ℃延伸 2 min(共 20 个循环);72 ℃终延伸 7 min[22]。

(3) 电泳检测:接通电泳仪,设定电流 45 mA,电压 80 V,当指示染料前沿迁移至胶体的 2/3 处停止电泳,整个电泳持续约 30 min,跑胶验证。

(4) PCR 产物检测:将 PCR 产物送至南京金斯瑞生物技术有限公司测序,比对测序结果对微生物进行鉴定。

2　结果与分析

2.1　降柠檬酸酵母的筛选

2.1.1　降酸酵母菌的筛选与保藏　通过对柠檬酸厂废水废渣中菌株的富集培养,分离纯化,共得到可在柠檬酸培养基中生长的疑似酵母菌 15 株。按 1.2.2 中方法对这些菌株进行保藏。

2.1.2　降酸菌株在柠檬酸培养基中的筛选　配制柠檬酸液体培养基,以柠檬酸为唯一碳源培养菌株,筛选具有较强降柠檬酸能力的菌株,测得柠檬酸培养基中柠檬酸初始含量为 11.3 g/L。对 15 株保藏菌株进行平板活化,另取两株商业酿酒酵母菌作为对照。挑取平板单菌落接入 50 mL YPD 液体培养基中培养,获得种子培养基,将种子培养基接入柠檬酸培养基,接种量 4%。恒温摇床培养 5 d,培养条件 30 ℃,150 r/min。发酵结束后培养基的残余柠檬酸含量见图 1。

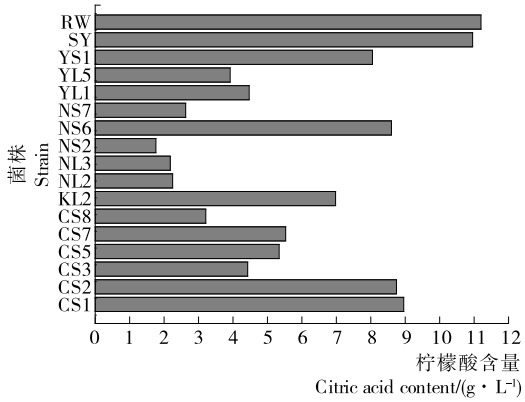


图 1　菌株的柠檬酸降解能力

Figure 1　The capability of reducing citric acid

由图 1 可知,各个菌株的降柠檬酸能力强弱不一。菌株 NS2、NS7、NL2、NL3、CS8 具有较强的柠檬酸降解能力,发酵 5 d 后可降解培养基中 70%以上的柠檬酸,其余菌株的降柠檬酸能力相对较弱,而商业酿酒酵母菌 RW 和 SY 在该条件下生长受到明显抑制,难以降解利用柠檬酸。其中菌株 NS2 的降柠檬酸能力最强,在发酵 5 d 后柠檬酸含量从 11.2 g/L 下降到 1.76 g/L,降解培养基中约 84%的柠檬酸,对降柠檬酸能力较强的菌株 NS2、NS7、NL2、NL3、CS8 进行进一步研究。

2.2 菌株酒精耐受性试验

由于菌株需应用于山楂酒酿造中，因此需要对菌株的酒精耐受性进行试验，确定菌株的酒精耐受能力后选取具有较强酒精耐受性的菌株，将其应用于山楂酒酿造的适当阶段。

由图 2 可知，5 株菌株对酒精耐受性有所差异。在酒精度为 0%vol 时，5 株菌的生长情况均良好，但随着酒精度的升高，菌液浓度逐渐下降。酒精度在 1%～4%vol 时，5 株菌均可以生长，其中 NS2 酒精耐受能力最强，NL2 次之，这两株菌生长情况良好，其余 3 株菌的生长则受到明显抑制。当酒精度上升到 5%vol 时，5 株菌的菌液浓度均处在较低水平，当酒精度达到 6%vol 时，菌株都已经难以生长。可以看出菌株 NS2、NL2 的酒精耐受能力相对较强，可以耐受 0%～4%vol 的酒精度。初步判断这 5 株菌均非酿酒酵母，选取酒精耐受能力相对较强的 NS2、NL2 进行培养观察鉴定。

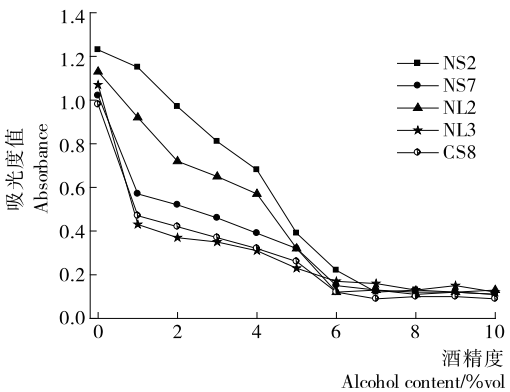


图 2 菌株酒精度耐受性测试结果

Figure 2 The stress resistance of ethanol

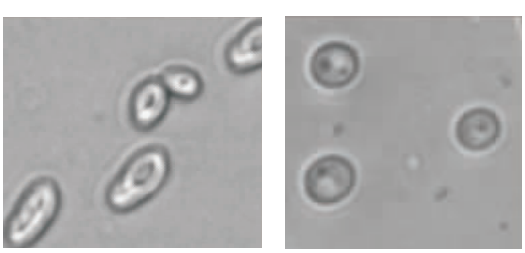
2.3 菌株形态学鉴定

酵母菌的菌落培养特征与个体形态特征，是酵母菌种鉴定的重要依据之一[23]7-8。

2.3.1 菌落培养特征 菌株 NS2 的菌落大而厚，表面不光滑，具有细微褶皱，菌落边缘呈细小的锯齿状；菌落颜色呈乳白色，正反面及内外颜色一致；易用针挑起，菌落质地均匀。菌株 NL2 的菌落呈圆形，大且中间略有凸起，菌落边缘呈锯齿状，颜色呈白色，质地均匀。

2.3.2 液体培养基培养特征 两株菌的菌液均明显浑浊，静置后表面均形成一层较薄的白色醭膜。

2.3.3 个体形态特征 对菌株进行 40×10 倍显微镜镜检，镜检结果见图 3。



（a）NS2 （b）NL2

图 3 菌株 NS2、NL2 的细胞形态

Figure 3 The Cell morphology (× 400) of the strain NS2 and NL2

菌株 NS2 的细胞形态为椭圆形，细胞大小（长×宽）约为 3.0～4.5 μm×3.5～6.0 μm；菌株 NL2 的细胞形态为圆形，细胞大小（长×宽）约为 4～5 μm×4～5 μm。

2.4 菌株生理生化试验

2.4.1 糖发酵试验结果 一半以上的酵母菌在半厌氧条件下至少可以发酵 *D*-葡萄糖，若菌株可以利用该化合物，则菌株可以通过无氧机制对糖类化合物进行分解代谢，释放气体。通过寻找收集形成的 CO_2 气体可以鉴定菌株对该发酵糖的利用能力[23]25-26。菌株 NS2、NL2 的糖发酵试验结果见表 1。

表 1 糖发酵试验结果†

Table 1 The ability of the strains to ferment sugars

发酵糖	NS2	NL2
葡萄糖	+	+
蔗糖	+	+
乳糖	−	−
麦芽糖	−	+
D-半乳糖	+	+

† “+”表示阳性，“−”表示阴性。

2.4.2 碳源同化试验 不同酵母菌对某种有机化合物作为单一碳源的利用能力存在差异，通过这些差异可以在一定程度上区分不同酵母菌。这些化合物包括糖类、多羟糖醇和有机酸类。碳源同化试验即为鉴定酵母菌在好氧环境下利用这些化合物的能力[23]20-24。菌株 NS2、NL2 碳源同化试验结果见表 2。

2.4.3 氮源同化试验 有研究[23]24-25发现大约有 1/4 的酵母菌可以利用硝酸盐及其他含氮化合物，因此氮源同化试验对于鉴定酵母具有重要的应用价值。菌株 NS2、NL2 的氮源同化试验见表 3。

表 2 碳源同化试验†

Table 2 Carbon Assimilation of the strains

碳源	NS2	NL2	碳源	NS2	NL2
葡萄糖	+	+	甲醇	−	−
乳糖	−	−	乙醇	−	+
蔗糖	+	+	肌醇	−	−
D-半乳糖	+	+	甘露醇	+	+
可溶性淀粉	−	+	柠檬酸	+	+
麦芽糖	+	+	琥珀酸	+	−
甘油	+	−			

† “+”表示阳性，“−”表示阴性。

表 3 氮源同化试验†

Table 3 Nitrogen Assimilation of the strains

氮源	NS2	NL2
硝酸钾	−	−
硝酸钠	−	−
硫酸铵	−	−
尿素	−	−

† “+”表示阳性，“−”表示阴性。

综合以上试验结果对菌株 NS2、NL2 的形态学特征及生理生化进行分析比对,对照文献[23]$^{34-44}$中对于酵母菌的描述,菌株 NS2 符合毕赤酵母菌的生理生化及形态学特征,菌株 NL2 符合热带假丝酵母的生理生化及形态学特征,因此初步判断这两株菌分别为毕赤酵母菌、热带假丝酵母菌。

2.5　菌株分子生物学鉴定

按 1.2.6 中方法提取菌株的 DNA,进行 18S rDNA PCR 扩增,电泳图见图 4,两株菌的 PCR 产物均在 1 700 bp 处有明亮条带,判断得到的产物为目的产物。

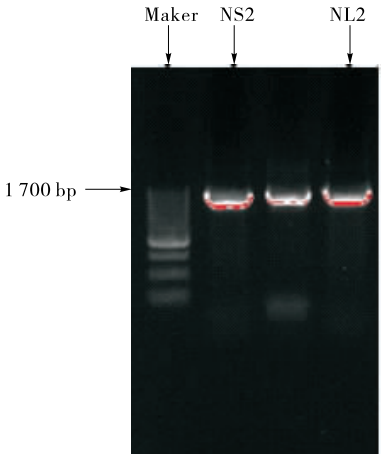


图 4　菌株 NS2 和 NL2 的 18S rDNA PCR 扩增电泳图

Figure 4　Result of 18S rDNA PCR amplify of NS2 and NL2

将扩增产物送至金斯瑞公司测序,NS2、NL2 的测序结果见附录 1。菌株 NS2、NL2 经 PCR 扩增获得的 18S rDNA 序列全长为 1 700 bp 左右,在 NCBI 中 BLAST 比对进行序列同源性分析,菌株 NS2 的 18S 序列与 *Pichia sp.*的 18S 序列同源性最高,相似性达 99%。根据 18S 序列使用 MAGE 软件的 Neighbor-Joining 法构建系统发育树,见图 5。由图 5 可知,NS2 与库德里阿兹威毕赤酵母(*Pichia kudriavzevii*)亲缘关系最近,同源性极高,因此将菌株 NS2 鉴定为 *Pichia kudriavzevii*。

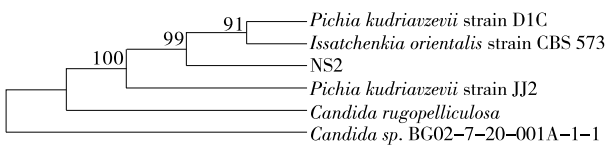


图 5　基于菌株 NS2 的 18S rDNA 序列同源性构建的系统发育树

Figure 5　Phylogenetic tree of NS2 based on 18S rDNA sequences

菌株 NL2 的 18S 序列与 *Candida sp.*的 18S 序列同源性最高,相似性达 99%。根据 18S 序列使用 MAGE 软件的 Neighbor-Joining 法构建系统发育树,见图 6。由图 6 可知,NL2 与热带假丝酵母(*Candida tropicalis*)亲缘关系最近,同源性极高,因此将菌株 NL2 鉴定为 *Candida tropicalis*。

3　结论

本研究从柠檬酸废水废渣中分离培养纯化获得15株耐柠檬酸菌株,测定降柠檬酸能力发现其中 5 株菌株具有较强的降柠檬酸能力,发酵 5 d 后柠檬酸含量从 11.3 g/L 下降到 1.8～2.8 g/L,降解了培养基中 70%以上的柠檬酸。测试这 5 株菌的酒精耐受性,发现菌株 NS2 和 NL2 的酒精耐受能力相对较强,最高可以耐受 4%vol 的酒精度,可以考虑将其应用于山楂酒酿造初期阶段。对这两株菌进行形态学观察和生理生化性质分析,结合分子生物学手段初步鉴定菌株 NS2 为 *Pichia kudriavzevii*,菌株 NL2 为 *Candida tropicalis*,为今后研究生物降酸法降低山楂酒中柠檬酸提供了理论支持。

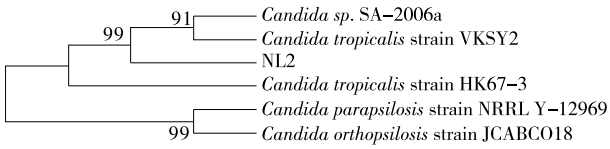


图 6　基于菌株 NL2 的 18S rDNA 序列同源性构建的系统发育树

Figure 6　Phylogenetic tree of NL2 based on 18S rDNA sequences

参考文献

[1] ZHU Ru-gang, SUN Yan-di, LI Tuo-ping, et al. Comparative effects of hawthorn (Crataegus pinnatifida Bunge) pectin and pectin hydrolyzates on the cholesterol homeostasis of hamsters fed high-cholesterol diets[J]. Chemico-Biological Interactions, 2015, 238: 42-47.

[2] 文连奎, 赵薇, 张微, 等. 果酒降酸技术研究进展[J]. 食品科学, 2010, 31(11): 325-328.

[3] 张方艳, 蒲彪, 陈安均. 果酒降酸方法的研究现状[J]. 食品工业科技, 2014, 35(1): 390-393.

[4] 莫燕霞, 殷居易, 顾晓俊, 等. 葡萄酒有机酸研究现状及应用展望[J]. 食品工业科技, 2015, 36(6): 380-384.

[5] 孙慧烨. 不同方法降解苹果酒中有机酸的比较和优化[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2015: 13-14.

[6] 梁国伟, 徐亮, 张宝荣, 等. 山楂酒酿造工艺研究及山楂酒中有机酸的 HPLC 测定[J]. 酿酒科技, 2009(7): 106-108.

[7] 胡楠, 刘晓兰, 郑喜群, 等. 发酵型五味子果酒离子交换树脂降酸工艺研究[J]. 食品与机械, 2013, 29(5): 29-32.

[8] VERA E, RUALES J, DORNIER M, et al. Deacidification of clarified passion fruit juice using different configurations of electrodialysis[J]. Journal of Chemical Technology & Biotechnology, 2003, 78(8): 918-925.

[9] FIDALEO M, MORESI M. Electrodialysis Applications in The Food Industry[J]. Advances in Food & Nutrition Research, 2006, 51(51): 265-360.

[10] VERA E, RUALES J, DORNIER M, et al. Comparison of different methods for deacidification of clarified passion fruit juice [J]. Journal of Food Engineering, 2003, 59(4): 361-367.

[11] VILJAKAINEN S K, LAAKSO S V. The use of malolactic Oenococcus oeni (ATCC 39401) for deacidification of media containing glucose, malic acid and citric acid[J]. European Food Research and Technology, 2000, 211(6): 438-442.

(下转第 13 页)

[23] YANG Chun-xiang, WANG Yi-ju, LIANG Zhen-chang, et al. Volatiles of grape berries evaluated at the germplasm level by headspace-SPME with GC-MS[J]. Food Chem, 2009, 114(3): 1 106-1 114.

[24] YE Xu-dong, AL-BABILI S, KLÖTI A, et al. Engineering the provitamin A (beta-carotene) biosynthetic pathway into (carotenoid-free) rice endosperm[J]. Science, 2000, 287(5 451): 303-305.

[25] LIN Yong-jun, ZHANG Qi-fa. Optimising the tissue culture conditions for high efficiency transformation of indica rice[J]. Plant Cell Rep, 2005, 23(8): 540-547.

[26] DEVI K, MISHRA S K, SAHU J, et al. Genome wide transcriptome profiling reveals differential gene expression in secondary metabolite pathway of *Cymbopogon winterianus*[J]. Sci Rep, 2016, DOI:10.1038/srep21026.

[27] MA Jiang-shan, ZHANG Ke-ke, HUANG Mei, et al. Involvement of Fenton chemistry in rice straw degradation by the lignocellulolytic bacterium Pantoea ananatis Sd-1[J]. Biotechnology for Biofuels, 2016, 9: 211.

[28] LIVAK K J, SCHMITTGEN T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2[-Delta Delta C(T)] Method[J]. Methods, 2001, 25(4): 402-408.

[29] STROBEL G A. Endophytes as sources of bioactive products [J]. Microbes Infect, 2003, 5(6): 535-44.

[30] LOGAN N A, DE Vos P. *Bacillus*[M]// Bergey's Manual of Systematics Bacteriology. New Youk: Springer, 2015: 3-124.

[31] AJAYI E O, SADIMENKO A P, AFOLAYAN A J. GC-MS evaluation of *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf oil obtained using modified hydrodistillation and microwave extraction methods[J]. Food Chem, 2016, 209(15): 262-266.

[32] LANGE B M, RUJAN T, MARTIN W, et al. Isoprenoid biosynthesis: the evolution of two ancient and distinct pathways across genomes[J]. PNAS, 2000, 97(24): 13 172-13 177.

[33] LICHTENTHALER H K. The 1-deoxy-d-xylulose-5-phosphate pathway of isoprenoid biosynthesis in plants[J]. Annu Rev Plant Phys, 1999, 50: 47-65.

[34] KASAHARA H, HANADA A, KUZUYAMA T, et al. Contribution of the mevalonate and methylerythritol phosphate pathways to the biosynthesis of gibberellins in *Arabidopsis*[J]. J Biol Chem, 2002, 277(47): 45 188-45 194.

(上接第 7 页)

[12] 陈继峰, 杨美容, 李绍华. 葡萄酒酿造过程中调酸方法研究[J]. 酿酒, 2005, 32(1): 35-39.

[13] 季建生. 干型杨梅果酒降酸的研究[J]. 酿酒科技, 2008(7): 73-75.

[14] 赵燕, 任美燕, 李帅. 猕猴桃果酒降酸研究[J]. 粮食科技与经济, 2012, 37(1): 55-57.

[15] MILLER B J, FRANZ C M, CHO G S, et al. Expression of the malolactic enzyme gene (mle) from Lactobacillus plantarum under winemaking conditions[J]. Current Microbiology, 2011, 62(6): 1 682-1 688.

[16] GAO Chong-xiao, FLEET G H. The degradation of malic acid by high density cell suspensions of Leuconostoc oenos[J]. Journal of Applied Microbiology, 2010, 76(6): 632-637.

[17] 王立芳. 一株可降解 *L*-苹果酸和柠檬酸菌株的鉴定及降解特性研究[D]. 长春: 吉林农业大学, 2011: 37-38.

[18] MAIO S D, POLIZZOTTO G, PLANETA D, et al. A method to discriminate between the Candida stellata and Saccharomyces cerevisiae in mixed fermentation on WLD and lysine agar media [J]. South African Journal for Enology & Viticulture, 2011, 32(1): 35-41.

[19] 薛军侠. 酿酒酵母的筛选鉴定及耐受性初步研究[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2007.

[20] 韩阳. 高产酒精酵母的筛选鉴定及生长和发酵特性研究[D]. 哈尔滨: 哈尔滨工业大学, 2007.

[21] 张霞, 武志芳, 张胜潮, 等. 贵州浓香型白酒大曲中霉菌的 18S rDNA 系统发育分析[J]. 应用与环境生物学报, 2011, 17(3): 334-337.

[22] 薛景波. 黄酒接种生麦曲微生物群落结构及分离培养微生物的产酶、产香性质分析[D]. 无锡: 江南大学, 2016: 12-13.

[23] 巴尼特. 酵母菌的特征与鉴定手册[M]. 青岛: 青岛海洋大学出版社, 1991.

信息窗

澳大利亚发布强制性过敏原标识问答

据澳大利亚农业与水利资源部消息,2017 年 5 月 18 日澳大利亚农业与水利资源部发布 IFN 08–17 通报,要求进口商做好过敏原标识工作。

按照澳新食品标准法典的要求,预包装食品要在标签上注明过敏原信息,这包括花生、树生坚果、牛奶、蛋、芝麻籽、鱼贝类、大豆、小麦、羽扇豆。

另外,对于无包装食品或不要求包装的食品(例如散装容器),过敏原信息需要附于货物,以便商家订购食品时了解过敏原信息。

澳大利亚农业与水利资源部要求进口商确保进口的食品符合规定。进口商需与供应商取得联系,要求他们提供食品中的过敏原信息,必要时给予一定的指导,确保不发生食物过敏事件。

澳大利亚农业与水利资源部表示, 过敏原信息未标注,会对过敏人群构成健康风险。按照 1992 进口食品控制法案的要求,如果进口商知晓或者没理由不了解进口食品中的过敏原信息,而进口了有风险的食品,那么属于违法行为,最高可判处 10 年徒刑。

(来源:www.foodmate.net)