

一株野生刺梨来源葡萄汁有孢汉逊酵母的鉴定及酿造学性能分析

李银凤, 刘 昕, 付 伟, 刘晓柱*
(贵州理工学院, 贵州 贵阳 550003)

摘要: 为鉴定一株野生刺梨来源产香酵母WR-27的种属类别与酿造学性能, 采用形态学结合分子生物学技术解析其种属类别, 分光光度法检测菌株的生长特性、酿造环境耐受性, 显色法分析其产硫化氢和 β -葡萄糖苷酶性能, 电子鼻系统分析其产香特性。结果表明, 菌株WR-27被鉴定为一株野生刺梨来源的葡萄汁有孢汉逊酵母(*Hanseniaspora uvarum*)。WR-27在对数生长期的生长性能低于商业化酿酒酵母X16。WR-27的葡萄糖耐受性、二氧化硫耐受性、碳源代谢特性与X16相似, 但对乙醇较为敏感, 仅可耐受3%的乙醇浓度。WR-27不产硫化氢, 高产 β -葡萄糖苷酶, 香气物质代谢能力强。因而, 菌株WR-27在酒类酿造中具有一定的应用潜能。

关键词: 野生刺梨; 葡萄汁有孢汉逊酵母; 种属鉴定; 酿造学特性

中图分类号: TS 261.1

文献标志码: A

文章编号: 1005-9989(2024)07-0018-06

Identification and Oenological Property Analysis of a Strain of *Hanseniaspora uvarum* Isolated from Wild *Rosa roxburghii* Tratt

LI Yinfeng, LIU Xin, FU Wei, LIU Xiaozhu*

(Guizhou Institute of Technology, Guiyang 550003, China)

Abstract: Morphological and molecular biology techniques were used to analyze the specie category and oenological properties of a strain of fruity-aroma producing yeast WR-27 isolated from wild *Rosa roxburghii* Tratt. Growth characteristics and brewing environment tolerances were detected by spectrophotometry, production of hydrogen sulfide and β -glucosidase were analyzed by chromogenic methods, and aroma production characteristics were analyzed by the electronic nose system. The results showed that WR-27 was identified as a strain of *Hanseniaspora uvarum* from wild *R. roxburghii*. The growth performance of WR-27 was lower than that of the commercial *Saccharomyces cerevisiae* X16 during the logarithmic growth period, and glucose tolerance and sulfur dioxide tolerances and carbon source metabolism characteristics were similar to *S. cerevisiae* X16. Besides, WR-27 was sensitive to ethanol stress, and

收稿日期: 2024-01-10

*通信作者

基金项目: 贵州省科技计划项目(黔科合基础-ZK[2023]一般137)。

作者简介: 李银凤(1984—), 女, 山西朔州人, 硕士, 讲师, 研究方向为农业微生物资源开发。

could tolerate 3% ethanol treatment. In addition, WR-27 does not produce hydrogen sulfide and has high yield of β -glucosidase and strong metabolic capacity of aroma substances. Therefore, the strain of WR-27 has certain application potential in wine fermentation.

Key words: wild *Rosa roxburghii* Tratt; *Hanseniaspora uvarum*; specie identification; oenological property

0 引言

刺梨(*Rosa roxburghii* Tratt)是一种我国特有的多年生落叶植物,其果实含有丰富的营养成分和多种活性成分^[1]。近年来,在刺梨栽培与品种选育^[2]、活性成分提取与功能分析^[3]、基因克隆与表达^[4]以及香气物质鉴定^[5]等领域受到了较多的关注和深入研究。但目前对刺梨微生物的分离、鉴定和功能方向的研究还比较薄弱,对刺梨微生物酿造学性能的认识还比较浅显,亟需加强。

酵母菌可代谢原料中的底物为酒精及多种风味物质,是酒类发酵中主要生产菌种。因而,筛选优质并具有潜在应用价值的酵母菌一直以来都是酒类研究领域的重要研究方向。本课题组近年来聚焦刺梨酵母菌的分离、鉴定及应用潜能研究,对刺梨主要栽培品种(贵农5号)酵母菌种属多样性及动态变化进行了分析^[6],并对多株可培养酵母菌的发酵潜能进行了鉴定^[7-10]。本研究进一步聚焦于野生刺梨品种,对一株产香浓郁的酵母菌进行了鉴定和酿造学性能分析。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

本研究所用商业化酿酒酵母菌(*Saccharomyces cerevisiae*)X16:法国LAFFORT公司,用作对照组;菌株WR-27:分离于野生刺梨自然发酵液,保存于本实验室,用作实验组。

YPD、WL培养基、赖氨酸培养基、亚硫酸铋培养基:贵州博奥瑞杰生物科技有限公司;对硝基苯基- β -D-吡喃葡萄糖苷(p-Nitrophenyl β -D-glucopyranoside, p-NPG):上海源叶生物公司;其余试剂:国产分析纯,贵州博奥瑞杰生物科技有限公司。

1.2 仪器与设备

GR60DA高压蒸汽灭菌锅:北京盛科信德科技有限公司;雷磁PHSJ-3F pH仪:上海仪电科学仪器股份有限公司;DHP-420恒温培养箱:天津

天泰仪器有限公司;ZD-85A型恒温摇床:常州朗越仪器制造有限公司;PEN3型电子鼻:德国AIRSENSE公司。

1.3 实验方法

1.3.1 菌株活化 将-80℃保存的酵母菌株X16、WR-27菌株划线于YPD固体培养基,28℃恒温倒置培养72 h,4℃保存,用于菌株的鉴定及性能分析。

1.3.2 菌株鉴定 形态学鉴定:将活化后的菌株WR-27划线于YPD、赖氨酸及WL培养基,28℃倒置培养72 h,培养结束后,观察记录菌株的生长及菌落形态特征。挑取菌株WR-27单克隆,草酸铵结晶紫染色后,置于显微镜观察细胞形态特征。

分子生物学鉴定:采用PCR方法,分别利用NL引物和ITS引物,扩增菌株26S rDNA D1/D2区域和ITS区域。NL引物序列(5'-3'): NL1: GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG; NL4: GGTCCGTGTTTCAAGACGG。ITS引物序列(5'-3'): ITS1: TCCGTAGGTGAACCTGCGG; ITS4: TCCTCCGCTTATTGATATGC。PCR反应体系参考赵湖冰等^[11]、刘晓柱等^[12]的方法进行。PCR反应结束后,取5 μ L反应产物进行琼脂糖凝胶电泳检测,扩增成功的PCR产物送生工生物工程(上海)股份有限公司进行序列测定,测序结果在NCBI上进行BLAST同源序列搜索比对。

1.3.3 生长曲线测定 将活化后的菌株WR-27接种至YPD液体培养基中,28℃、180 r/min恒温振荡培养36 h,每隔4 h取样一次,于波长600 nm处测定其光密度值(OD),每组平行重复实验3次。

1.3.4 酿造环境耐受性测定 将活化后的菌株WR-27分别接种于含有不同质量浓度葡萄糖(100、150、200、250、300 g/L)、不同体积分数乙醇(0%、3%、6%、9%、12% V/V)、不同质量浓度二氧化硫(50、100、150、200、250 mg/L)及不同质量浓度柠檬酸(1.5%、2.0%、2.5%、3.0%)的YPD液体培养基中,28℃、180 r/min恒

温振荡培养36 h。培养结束后，分别测定各组培养液OD_{600 nm}值。

1.3.5 碳源代谢特性检测 将活化后的菌株WR-27分别接种于含2%不同碳源(葡萄糖、果糖、蔗糖、麦芽糖、乳糖、半乳糖、甘露糖、阿拉伯糖)的0.6%酵母浸粉溶液中，内置杜氏小管，28 ℃恒温静置培养48 h，记录杜氏小管顶部是否有气泡，有气泡则标记为“+”，反之则标记为“-”。

1.3.6 产硫化氢特性检测 利用亚硫酸铈培养基检测菌株WR-27产硫化氢特性。具体操作方法参考刘晓柱等^[12]的方法进行。根据滤纸片颜色，判定菌株产硫化氢的强弱特性。

1.3.7 产β-葡萄糖苷酶活性测定 利用p-NPG法检测菌株WR-27产β-葡萄糖苷酶活性。将菌株WR-27接种于YPD液体培养基中，28 ℃、180 r/min振荡培养72 h。培养结束后，培养液以3000 r/min离心10 min，取上清液用于测定菌株产β-葡萄糖苷酶活性^[12]。

1.3.8 发酵产香特性分析 将活化后的菌株WR-27接种于YPD液体培养基内，28 ℃静置发酵8 d。发酵结束后，4000 r/min离心10 min，取上清液用于测定香气特性。

采用电子鼻系统测定发酵液香气特性^[13]。量取样品10 mL于电子鼻专用进样瓶中，富集气体15 min。测定程序为清洗200 s，归零5 s，准备5 s，进样测量100 s，气体流量200 mL/min。

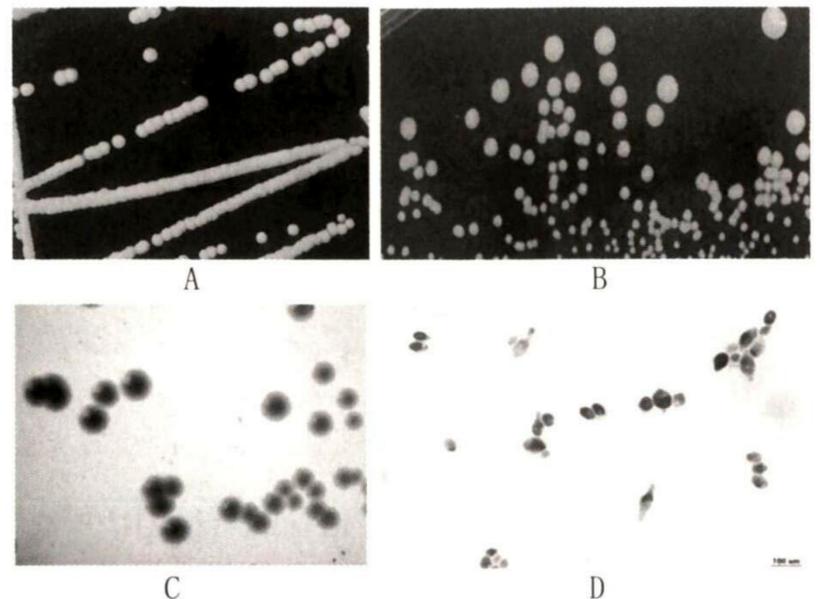
1.3.9 数据分析 本研究实验均平行重复3次，实验结果以平均值±标准差形式表示。2组数据间采用t检验分析进行差异显著性分析， $P < 0.05$ 表示差异具有显著性。

2 结果与分析

2.1 菌株鉴定结果

首先采用形态学方法对菌株WR-27进行鉴定。菌株WR-27在YPD培养基上菌落呈圆形、凸起、不透明、白色(图1A)；菌株WR-27可以在赖氨酸培养基上生长，菌落圆形、凸起、白色(图1B)；菌株WR-27在WL培养基上的菌落为圆形、凸起、表面光滑、边缘浅绿色、中间深绿色、不透明(图1C)；菌株WR-27的细胞形态为椭球形或柠檬形状，出芽生殖(图1D)。结合形态学特征初步判定菌株WR-27为有孢汉逊酵母属酵母(*Hanseniaspora* sp.)。

进一步采用分子生物学方法对菌株WR-27进行



注：bar=100 μm。

图1 菌株WR-27在YPD培养基(A)、赖氨酸培养基(B)、WL培养基(C)上形态特征及细胞显微形态(D)

鉴定，结果如图2所示，菌株26S rDNA D1/D2区域和ITS区域扩增条带特异性和完整性均较好。扩增产物经序列测定和BLAST比对发现，菌株WR-27与葡萄汁有孢汉逊酵母(*Hanseniaspora uvarum*)高度同源，同源性均超过99%。因而，结合形态学与分子生物学鉴定结果判断该菌株为一株野生刺梨来源的*H. uvarum*。

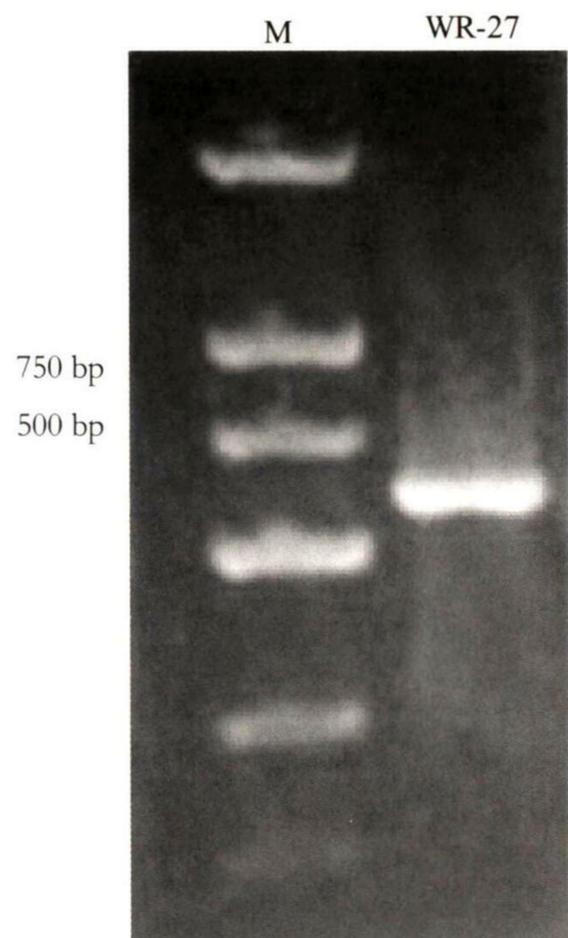


图2 菌株WR-27的26S rDNA D1/D2区域和ITS区域PCR扩增结果

2.2 菌株生长特性检测结果

菌株WR-27生长曲线如图3所示，菌株在对数生长期(4~16 h)生长低于商业化酿酒酵母X16；

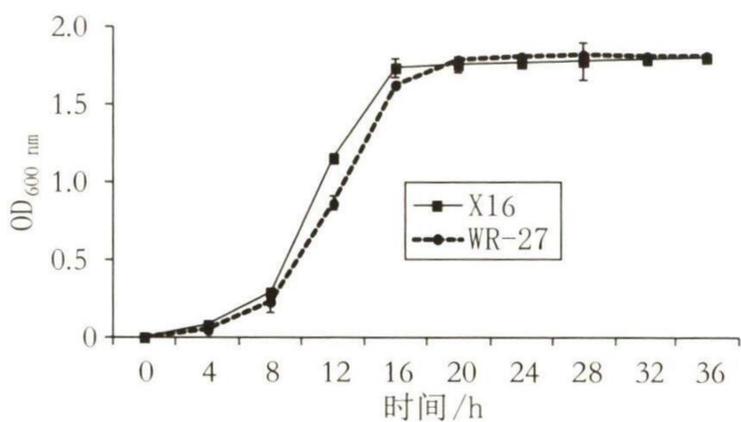
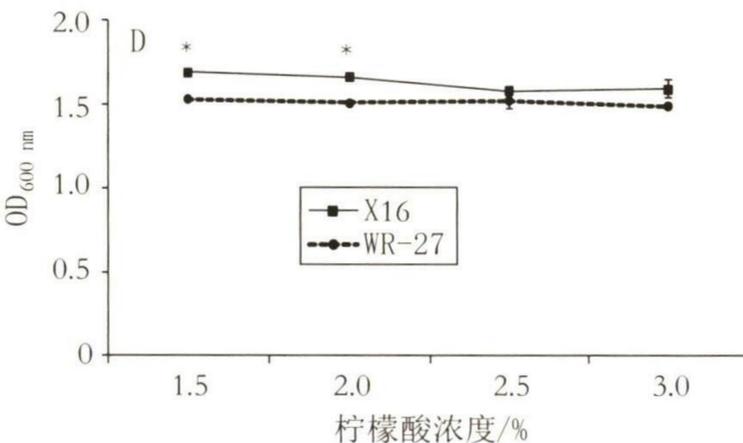
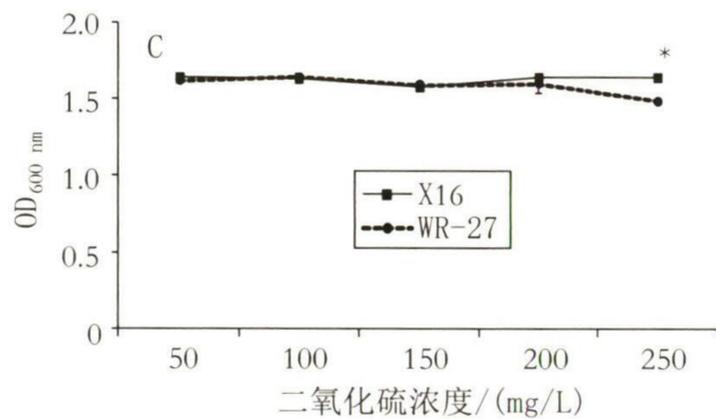
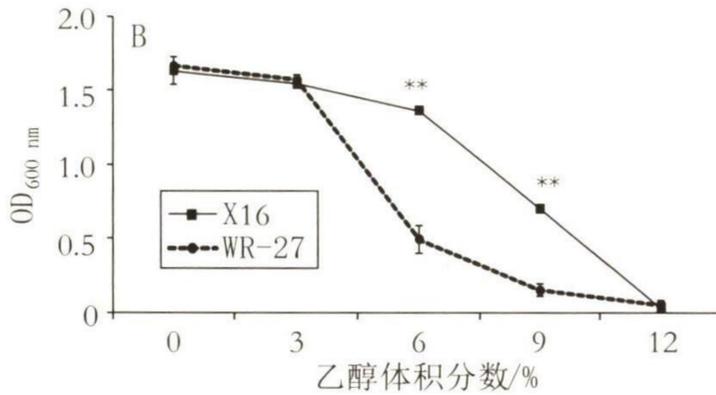
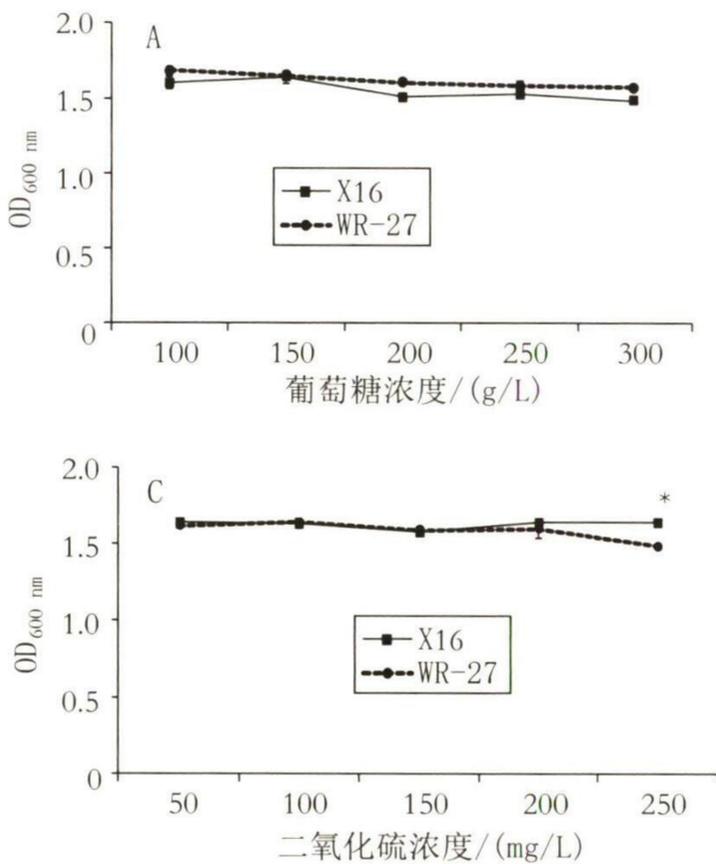


图3 菌株WR-27生长曲线



注：与X16组相比较，* $P < 0.05$ ，** $P < 0.01$ 。

图4 菌株WR-27对葡萄糖(A)、乙醇(B)、二氧化硫(C)、柠檬酸(D)的耐受性

的二氧化硫处理后，菌株WR-27的 $OD_{600\text{ nm}}$ 值与X16之间无显著性差异，但当二氧化硫浓度达到250 mg/L后，菌株WR-27的 $OD_{600\text{ nm}}$ 显著低于X16(图4C)；菌株WR-27在1.5%~2.0%柠檬酸条件下生长显著低于X16，当柠檬酸浓度为2.5%~3.0%时，菌株WR-27生长与X16一致，二者无显著性差异(图4D)。

2.4 菌株碳源代谢特性检测结果

表1 菌株WR-27碳源代谢特性检测结果

菌株	葡萄糖	蔗糖	乳糖	麦芽糖	半乳糖	甘露糖	果糖	阿拉伯糖
X16	+	+	+	+	+	+	+	-
WR-27	+	+	+	-	+	+	+	-

如表1所示，在所测试的8种碳源(糖类)中，菌

在适应期(0~4 h)与稳定期(16~36 h)菌株WR-27与X16生长基本一致，特别是在稳定期，菌株WR-27菌体浓度达到最大值，与X16生长同步。

2.3 菌株酿造环境耐受性检测结果

菌株WR-27酿造环境耐受性结果如图3所示，在质量浓度为100~300 g/L的葡萄糖(图4A)，菌株WR-27生长与X16之间无显著差别，生长趋势基本一致；菌株WR-27对乙醇较为敏感，仅可耐受3%乙醇浓度(图4B)；在质量浓度为100~200 mg/L

株WR-27不能代谢麦芽糖和阿拉伯糖。除麦芽糖外，菌株WR-27碳源代谢特性与X16一致，均能够代谢葡萄糖、蔗糖、乳糖、半乳糖、甘露糖、果糖。

2.5 菌株产硫化氢性能检测结果

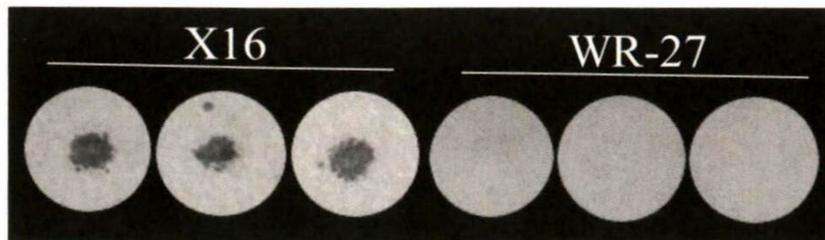
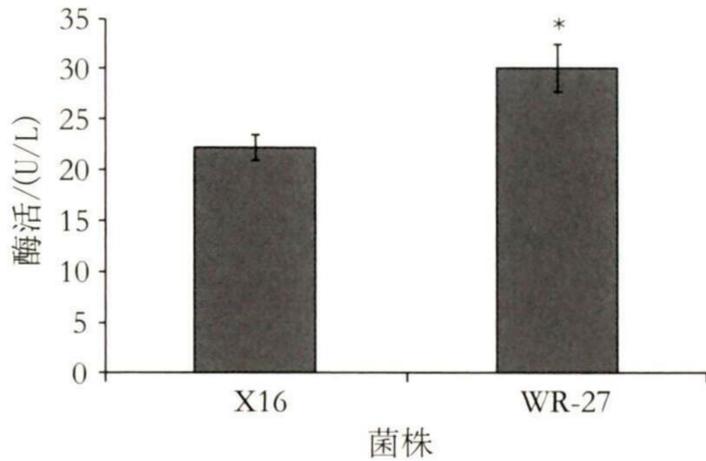


图5 菌株WR-27产硫化氢性能

根据菌株在亚硫酸铋培养基上生长时滤纸片颜色深浅，可判断其产硫化氢能力的强弱。菌株WR-27在亚硫酸铋培养基上生长情况如图5所示，

其滤纸片颜色为白色，表明其不产硫化氢；X16的滤纸片颜色为棕色，说明其产硫化氢强于WR-27。

2.6 菌株产 β -葡萄糖苷酶性能检测结果



注：与X16组相比较，* $P < 0.05$ 。下图同。

图6 菌株WR-27产 β -葡萄糖苷酶性能

采用p-NPG法检测了菌株WR-27产 β -葡萄糖苷酶性能，其结果如图6所示。菌株WR-27产 β -葡萄糖苷酶能力显著高于商业化酿酒酵母X16，其值约为X16的1.4倍。因而菌株WR-27具有较好的产 β -葡萄糖苷酶能力。

2.7 菌株发酵产香性能检测结果

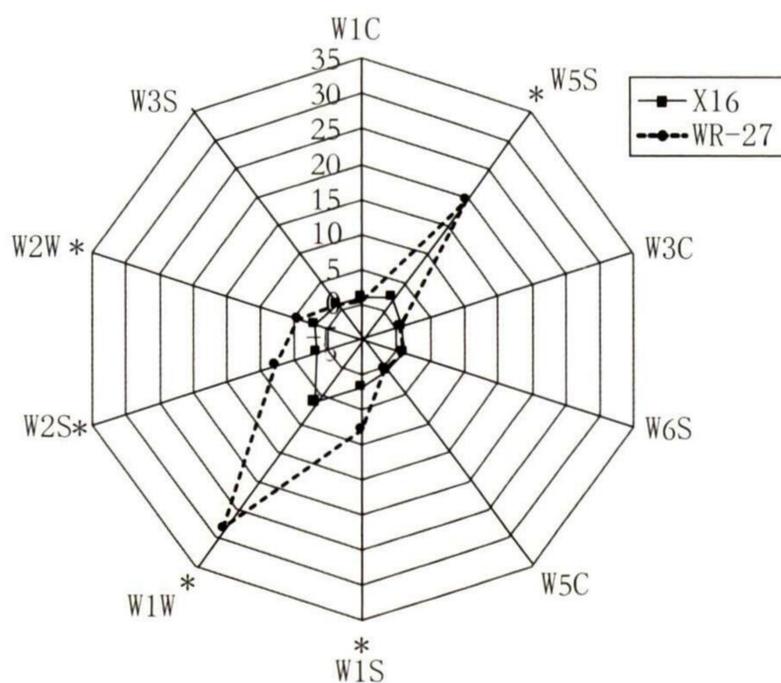


图7 电子鼻检测菌株WR-27发酵产香特性雷达图

如图7所示，菌株WR-27发酵液的W5S、W1S、W1W、W2S、W2W响应值均显著高于X16，表明菌株WR-27产氮氧化合物、甲基类化合物、无机硫化物、醇类和醛酮类化合物和有机硫化物的性能强于X16菌株；菌株WR-27发酵液的W1C、W3C、W6S、W5C、W3S响应值与X16之间相似，无显著性差异，表明菌株WR-27发酵产苯类、氨类、氢化物、短链烷烃、长链烷

烃能力与菌株X16一致。

3 结论与讨论

刺梨果实因其丰富的营养成分(如有机酸、矿物质、氨基酸等)和活性成分(如维生素C、多糖、黄酮等)使其成为一种“明星水果”^[14]，受到研究者的青睐和当地政府的高度重视。贵州省将刺梨产业作为“农村产业革命”的十二大产业之一，进行重点发展。然而刺梨果实中酸类物质和酚类物质含量较高，使其口感酸涩，消费者接受度不高。因而刺梨被广泛加工成各类加工产品，如果酒^[15]、果醋^[16]、果脯^[17]等。酵母菌是果酒、果醋等发酵产品的主要生产菌种，然而目前对刺梨酵母菌的研究还比较薄弱。本研究聚焦野生刺梨品种，对一株来源于野生刺梨的酵母菌进行了鉴定和酿造学性能分析，因而具有较好的创新性和实践意义。

*H. uvarum*是一类在自然界广泛存在的酵母菌，在多种水果上均被分离到，在酒类生产中具有重要用途，如调节酒类风味特性^[18]。本研究对一株产香浓郁的野生刺梨酵母菌WR-27进行了鉴定，发现该菌株为*H. uvarum*。该菌株产 β -葡萄糖苷酶能力显著高于商业化酿酒酵母X16。此外，该菌株的产 β -葡萄糖苷酶能力也高于栽培刺梨来源的*H. uvarum*菌株F119^[19]、F13^[11]、F110、C26和C31^[20]的活性。同时评价了其酿造学性能。 β -葡萄糖苷酶是一类可水解含 β -葡萄糖苷键底物，释放具有香气特性的游离糖苷配体的水解酶，可用于食品的增香^[21]。菌株WR-27的 β -葡萄糖苷酶对食品风味有何影响还未知，在后续研究中将进行深入分析。

在酒类发酵生产中酵母菌面临着多种胁迫因子^[22]，如发酵前期的高糖、低酸胁迫，发酵后期的乙醇胁迫。因而对酿造环境具有较好的耐受性是筛选优质酵母菌的必要条件。本研究发现，菌株WR-27对葡萄糖、二氧化硫、柠檬酸具有较好的耐受性，尽管在250 mg/L的二氧化硫、1%和2%的柠檬酸胁迫时，菌株WR-27的生长低于商业化酿酒酵母X16。就菌株WR-27的综合评价而言，菌株WR-27对酿造环境仍具有较好的耐受性。

综上，本研究采用形态学与分子生物学方法鉴定了一株野生刺梨来源的*H. uvarum*菌株WR-27，其在对数生长期的生长性能低于商业化酿酒酵母X16。WR-27葡萄糖耐受性、二氧化硫耐受

性、碳源代谢特性与X16相似,但乙醇耐受性较差,仅可耐受3%的乙醇浓度。此外,WR-27不产硫化氢、高产 β -葡萄糖苷酶、香气物质代谢能力强。因而,菌株WR-27在酒类酿造中具有一定的应用潜能。

参考文献:

- [1] WANG L T, LV M J, AN J Y, et al. Botanical characteristics, phytochemistry and related biological activities of *Rosa roxburghii* Tratt fruit, and its potential use in functional foods: a review[J]. *Food & Function*,2021,12(4):1432-1451.
- [2] 金盛怀.刺梨的栽培管理与病虫害防治技术[J].*农业灾害研究*,2023,13(6):22-24.
- [3] 李呗,任廷远.刺梨功能活性成分及生理作用的研究进展[J].*贵州农业科学*,2022,50(11):84-92.
- [4] 龚丽莎,向芷莹,王照,等.刺梨CDPK基因家族的鉴定及其对供钙水平的表达响应[J].*果树学报*,2023,40(4):639-652.
- [5] 彭邦远,丁小娟,赵泽伟,等.水解释放刺梨汁键合态香气化合物及糖基组成解析[J].*食品与机械*,2019,35(7):13-19.
- [6] 刘晓柱,李银凤,于志海,等.刺梨自然发酵过程中非酿酒酵母多样性分析[J].*微生物学报*,2020,60(8):1696-1708.
- [7] LI Y F, DING P P, TANG X Y, et al. Screening and oenological property analysis of ethanol-tolerant non-*Saccharomyces* yeasts isolated from *Rosa roxburghii* Tratt[J]. *Frontiers in Microbiology*,2023,14:1202440.
- [8] LIU X Z, LI Y F, ZHAO H B, et al. Identification and fermentative properties of an indigenous strain of *Wickerhamomyces anomalus* isolated from *Rosa roxburghii* Tratt[J]. *British Food Journal*,2021,123(12):4069-4081.
- [9] LIU X Z, LI Y F, ZHOU J C, et al. Effects of co-inoculation and sequential inoculation of *Wickerhamomyces anomalus* and *Saccharomyces cerevisiae* on the physicochemical properties and aromatic characteristics of longan (*Dimocarpus longan* Lour.) wine[J]. *Quality Assurance and Safety of Crops & Foods*,2021,13(2):56-66.
- [10] 刘晓柱,黎华,李银凤,等.接种异常威克汉姆酵母对空心李果酒理化特性及香气组分的影响[J].*食品科技*,2020,45(11):21-27.
- [11] 赵湖冰,黎华,田野,等.一株刺梨非酿酒酵母的分离鉴定、生理特性及混菌发酵研究[J].*食品工业科技*,2020,41(16):114-120.
- [12] 刘晓柱,张远林,李银凤,等.高产 β -葡萄糖苷酶酵母菌的诱变选育及对刺梨果酒香气特性的影响[J].*食品工业科技*,2021,42(19):118-125.
- [13] 于志海,何书成,董文轩,等.基于智能感官和HS-SPME-GC-MS技术分析火龙果发酵酒的风味[J].*中国酿造*,2023,42(9):223-229.
- [14] XU J W, VIDYARTHI S K, BAI W B, et al. Nutritional constituents, health benefits and processing of *Rosa roxburghii*: a review[J]. *Journal of Functional Foods*,2019,60(2):103456.
- [15] 王宏,李登,黄星源,等.响应面法优化刺梨果酒发酵工艺研究[J].*中国酿造*,2021,40(6):124-128.
- [16] 刘春梅,代亨燕,苏晓光,等.刺梨果醋饮料的研制[J].*中国酿造*,2009,(10):155-157.
- [17] 胡晓红.刺梨果脯制作技术[J].*现代农业科技*,2020,(13):221,223.
- [18] MARTIN V, VALERA M J, RLAND K M, et al. Oenological impact of the *Hanseniaspora/Kloeckera* yeast genus on wines-a review[J]. *Fermentation*,2018,4(3):76.
- [19] 刘晓柱,赵湖冰,李银凤,等.一株刺梨葡萄汁有孢汉逊酵母的鉴定及酿酒特性分析[J].*食品与发酵工业*,2020,46(8):97-104.
- [20] LIU X Z, LI Y F, ZHAO H B, et al. Oenological property analysis of selected *Hanseniaspora uvarum* isolated from *Rosa roxburghii* Tratt[J]. *International Journal of Food Engineering*,2021,17(6):445-454.
- [21] 刘晓柱,张远林,黎华,等. β -葡萄糖苷酶在酒类酿造中研究进展[J].*中国酿造*,2020,39(6):8-12.
- [22] AUESUKAREE C. Molecular mechanisms of the yeast adaptive response and tolerance to stresses encountered during ethanol fermentation[J]. *Journal of Bioscience and Bioengineering*,2017,124(2):133-142.