

产 β -葡聚糖酶耐盐鲁氏酵母的筛选及鉴定

王志¹, 谢婷¹, 刘飞¹, 陈雄¹, 代俊¹, 曾雨雷², 李彪²

(1. 工业发酵湖北省协同创新中心, 发酵工程教育部重点实验室, 湖北工业大学生物工程学院, 湖北武汉 430068)

(2. 安琪酵母股份有限公司, 湖北宜昌 443000)

摘要: 从农家自制辣椒酱中分离纯化了一株耐盐酵母, 通过 β -1,3-葡聚糖酶鉴定(刚果红染色法)确定其具有合成、分泌胞外 β -1,3-葡聚糖酶特性。NaCl 耐受性研究确定其具有高耐盐性, 能经 144 h 的适应期后在 24% NaCl 的培养基 B 中稳定生长 120 h。经 26S rRNA 基因序列分析鉴定为鲁氏酵母 A (*Z. Rouxii* A)。Z. *Rouxii* A 发酵培养中存在二次生长现象, 其生物量在 24 h 和 48 h 达到峰值, 分别比 18 h 的 6.38 g/L 提高了 46.55% 和 87.15%, 而 21 h 后葡萄糖浓度仅维持在 1.57 g/L 左右, 说明: Z. *Rouxii* A 生长过程中合成、分泌的 β -葡聚糖酶持续降解发酵培养基中添加的 β -1,3-1,6-葡聚糖, 为其二次生长提供了碳源和能源。Z. *Rouxii* A 的 β -1,3-葡聚糖酶活性曲线与生长曲线基本趋势一致, 最大酶活性随着菌体自溶 (12 h、24 h 和 48 h) 而迅速降低, 48 h 达到酶活峰值 15.23 U/mL, 说明: Z. *Rouxii* A 的 β -1,3-葡聚糖酶合成与细胞生长偶联。以上数据确认该菌为产 β -葡聚糖酶高耐盐鲁氏酵母。

关键词: 鲁氏酵母; 26S rRNA; 耐盐性; β -葡聚糖酶

文章编号: 1673-9078(2015)1-120-125

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2015.1.022

Identification and Screening of β -glucanase-producing, Salt-tolerant

Zygosaccharomyces rouxii

WANG Zhi¹, XIE Ting¹, LIU Fei¹, CHEN Xiong¹, DAI Jun¹, ZENG Yu-lei², LI Biao²

(1. Hubei Collaborative Innovation Center for Industrial Fermentation, Key Laboratory of Fermentation Engineering (Ministry of Education), College of Bioengineering, Hubei University of Technology, Wuhan 430068, China) (2. Angel Yeast co., LTD., Yichang 443000, China)

Abstract: A salt-tolerant yeast strain was isolated and purified from a homemade chili sauce. Congo red agar plate method confirmed that the strain produced extracellular β -1,3-glucanase. The NaCl-tolerance test showed that the strain had high salt-tolerance, with stable growth observed for 120 h in medium B containing 24% NaCl after an adaptation period of 144 h. The strain was identified as *Zygosaccharomyces rouxii* A via 26S rRNA sequence analysis. Secondary growth phenomenon were observed during fermentation where the biomass reached peak values at 24 and 48 h, with an increase of 46.55% (9.35 g/L) and 87.15% (11.94 g/L), respectively, compared with that at 18 h (6.38 g/L). However, the glucose concentration remained constant at 1.57 g/L after 21 h. The results indicated that the β -1,3-glucanase produced by Z. *rouxii* A degraded the 1,3-1,6-glucan present in the substrate, thus providing carbon and energy sources for the secondary growth of cells. Additionally, β -1,3-glucanase activity curve was consistent with the growth curve for Z. *rouxii* A, which showed that maximum enzyme activity rapidly decreased with cell autolysis (12, 24, and 48 h), and peak enzyme activity level (15.23 U/mL) was reached at 48 h. The results suggest that β -1,3-glucanase synthesis was coupled with cell growth and that the strain could produce this enzyme in the presence of high salt concentration.

Key words: *Zygosaccharomyces rouxii*; 26S rRNA; salt-tolerance; β -1,3-glucanase

高盐稀态酱油酿造过程的盐浓度一般在 18% 左右, 而酱油的风味与酵母的活性关系密切^[1], 这对酵母的耐盐能力提出了较高的要求。鲁氏结合酵母 (*Zygosaccharomyces rouxii*) 是酱油酿造过程中的常用菌株之一, 是常见的嗜高渗透压酵母菌, 在 NaCl

浓度达到 18%~24% 时仍然可以生长^[2], 并通过代谢应答响应盐胁迫^[3~4]。

酱油酿造体系中存在丰富的酵母细胞壁资源, 但是, 其在提升酱油品质和功能中的作用还没有引起足够的重视。酵母细胞壁中含有丰富的 β -葡聚糖^[5], 其中碱不溶性 β -葡萄糖以 β -1,3-糖苷键为主链、以 β -1,6-糖苷键为侧链, 呈三股螺旋高级结构存在。除了可作为膳食纤维发挥作用以外, 具有一定分子量的三股螺旋结构的水溶性的 β -1,3-1,6-葡聚糖具有增强细胞免

收稿日期: 2014-06-30

基金项目: 湖北省重大科技专项项目 (2012ACA15)

作者简介: 王志 (1971-), 男, 副教授, 从事微生物工程研究

通讯作者: 陈雄 (1969-), 男, 教授, 从事功能酵母与酿造微生物研究

疫力、提高巨噬细胞活性及具有抗肿瘤等功效^[6~7]。由于具有三股螺旋结构的细胞壁葡聚糖大多因分子量较大而不溶于水,因而影响了其在提升功能酱油品质等方面的运用。因此,筛选高 β -1,3 葡聚糖酶活性酵母并将之运用在酱油酿造过程中,通过检测、控制、优化酿造工艺,稳定提高具有一定分子量的三股螺旋结构的水溶性的 β -1,3-1,6-葡聚糖的含量,对于填补活性葡聚糖功能酱油产品的市场空缺、提升酱油品质和竞争力具有重要意义。

本研究从湖北农家自制的辣椒酱中分离纯化得到了一株耐盐酵母,通过 β -1,3 葡聚糖酶鉴定(刚果红染色法)确定其具有合成、分泌胞外 β -1,3 葡聚糖酶特性。NaCl 耐受性研究确定该菌株具有高耐盐性,能经 144 h 的适应期后在 24% NaCl 的培养基 B 中稳定生长 120 h。运用 26S rRNA 序列分析鉴定该菌株为鲁氏酵母,并对其酶产量进行了初步研究。目前,还未见由耐盐鲁氏酵母产 β -1,3 葡聚糖酶的报道,本研究为其在高活性功能酿造食品中的应用打下了基础。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

1.1.1 材料

辣椒酱:湖北农家自制。

0.1%的刚果红溶液:0.9%的生理盐水配制而成。

1.1.2 培养基

YEPD 液体培养基^[8]:酵母浸粉 10 g、蛋白胨 20 g、葡萄糖 20 g、蒸馏水 1000 mL, pH 7.30±0.20, 115 °C 灭菌 30 min。

培养基 B^[9]:酵母浸粉 10 g、葡萄糖 50 g、蛋白胨 20 g、KH₂PO₄ 1 g、KCl 0.40 g、CaCl₂ 1.10 g、(NH₄)₂SO₄ 5 g、MnSO₄ 2.50 mg、FeCl₃ 2.50 mg、蒸馏水 1000 mL, pH 7.30±0.20, 115 °C 灭菌 30 min。

β -1,3 葡聚糖酶平板鉴定培养基(YEPD 液体培养基+0.10%的 β -1,3-1,6-葡聚糖):在 1000 mL 的 YEPD 液体培养基中添加 β -1,3-1,6-葡聚糖 1 g, 20 g 琼脂, 115 °C 灭菌 30 min。

1.1.3 仪器

DELTA 320 pH 计,梅特勒托利多仪器(上海)有限公司;立式压力蒸汽灭菌器,上海博迅实业有限公司医疗设备厂;TG18M 台式高速离心机,长沙平凡仪器仪表有限公司;HNY-211B 全温振荡培养箱,天津欧诺仪器仪表有限公司;冷冻离心机, Eppendorf 5417R 型(德国);UVmini-1240 紫外可见分光光度计,岛津制作所;PCR 仪, Eppendorf (德国);琼脂糖凝

胶电泳仪, Mupid-2plus (Advance, 日本);DRC-100H/DIX-254A 紫外凝胶成像系统, Gene 公司, 美国;SHZ-D (III) 循环水式真空泵, 巩义市予华仪器有限责任公司;生物传感仪, 山东省生物科学研究院。

1.2 方法

1.2.1 样品的采集

从辣椒酱中五个不同的位置分别取样品 1 g, 然后将五份混匀后合为一份装入灭过菌的 Eppendorf 管中。

1.2.2 耐盐酵母菌的分离、纯化及产 β -葡聚糖酶的定性实验

称取 1.00 g 样品加入盛有 9 mL 无菌水的试管中, 在涡旋器上充分振荡 10 min 使辣椒酱颗粒充分散开, 然后静置 5 min, 采用 10 倍梯度稀释法将上清液制成 10⁻⁵、10⁻⁶、10⁻⁷、10⁻⁸ 稀释液分别涂布到 NaCl 浓度为 18% 的 YEPD 平板(含 2% 琼脂)上, 倒置于 28 °C 培养箱中培养 7 d。

18% NaCl 的 YEPD 平板(含 2% 琼脂)上长出的菌落进行镜检, 将存在出芽生殖现象的菌落挑出, 并通过划线接种到相应的斜面培养基上。如果发现非纯培养的菌株, 再用接种环挑取少许菌苔在平板上划线分离。直到分离出单个菌落, 从而得到耐盐酵母菌株。

取 1 mL 用 YEPD 液体培养基活化后的耐盐酵母 A, 加入分装 9 mL 无菌水的试管中, 采用稀释平板涂布法获得 10⁻⁵、10⁻⁶、10⁻⁷、10⁻⁸ 的菌种 β -1,3 葡聚糖酶鉴定平板, 倒置于 28 °C 培养 8 天后, 用 0.10% 的刚果红溶液染色平板培养物 30 min, 后用 0.90% 的生理盐水置换刚果红溶液, 30 min 后去上清液。观察菌落周围是否形成透明圈, 其透明圈直径的大小与菌株的酶活性成正比, 获得产 β -葡聚糖酶耐盐酵母菌。

1.2.3 耐盐酵母 A 对 NaCl 耐受性生长曲线绘制

耐盐酵母 A 单菌落用 YEPD 液体培养基活化后, 以 3% 的接种量接入 100 mL 培养基 B 中(含 NaCl, 浓度为(m/V)为 12~24%), 28 °C, 180 r/min 培养, 周期取摇瓶样, 测定菌液在 600 nm 处的 OD 值。以培养时间(h)为横坐标, OD₆₀₀ 为纵坐标作图, 得到耐盐酵母 A 菌株在 12-24% NaCl 浓度下的生长曲线。

1.2.4 26S rRNA 基因序列分析

1.2.4.1 26S rRNA 基因序列引物的设计

26S rRNA 基因序列引物的设计(由上海英骏生物技术有限公司合成)如下:

NL 1 (5'-GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG-

3'); NL4(5'-GGTCCGTGTTTCAAGACGG-3')。

1.2.4.2 5×TAE 电泳缓冲液

5×TAE 电泳缓冲液: 40 mmol/L Tris-HCl(pH 8.0), 40 mmol/L 醋酸, 2 mmol/L EDTA (pH 8.0)。

EX-Taq DNA 聚合酶: 购自大连宝生物有限公司。

PCR 产物纯化试剂盒: 购自美国 Omega Bio-tek 公司。

1.2.4.3 染色体 DNA (小量) 的提取

(1) 取 1.50 mL 菌液于 1.5 mL Eppendorf 管中, 12000 r/min 离心 5 min。

(2) 弃上清, 900 μ L 磷酸缓冲液 (PBS) 重悬沉淀, 4 $^{\circ}$ C, 12000 r/min 离心 5 min。

(3) 弃上清, 加入 300 TE 和 200 μ L 10 mg/mL 溶菌酶, 吹吸混匀, 37 $^{\circ}$ C 温育 1 h, 每隔 15 min 颠倒混匀一次。

(4) 向沉淀加入 600 TENS 裂解液 (200 mmol/L NaCl, 100 mmol/L Tris-HCl pH 8.0, 2% SDS, 50 mmol/L EDTA, 0.50% Triton X-100) 和 20 mg/mL 蛋白酶 K 10 μ L, 颠倒混匀, 55 $^{\circ}$ C 温育 1 h, 每隔 15 min 颠倒混匀一次。

(5) 4 $^{\circ}$ C 12000 r/min 离心 5 min, 取上清。

(6) 向上清中加入等体积的 P:C:I (25:24:1) 充分混匀, 4 $^{\circ}$ C, 12000 r/min 离心 10 min。

(7) 重复步骤 6。

(8) 将上清转入新的 EP 管中, 加入 1/10 体积的 3 mol/L 醋酸钠, 2 倍体积的无水乙醇, 混匀, -20 $^{\circ}$ C 下放置 60 min, 4 $^{\circ}$ C, 12000 r/min 离心 10 min。

(9) 弃上清, 将离心管倒扣在吸水纸上, 吸干液体后风干, 加入 30 μ L 无菌水和 10 mg/mL RNase A 0.50 μ L, -20 $^{\circ}$ C 保存。

1.2.4.4 26S rRNA 基因序列的 PCR 扩增

(1) PCR 扩增引物

以刚提取并检测合格的染色体 DNA 为模板, 利用由上海英骏生物公司合成。

引物上游引物 NL1 (5'-GCATATCAATAAGCGG AGGAAAAG-3');

下游引物 NL4 (5'-GGTCCGTGTTTCAAGACG G-3');

进行 26S rRNA 基因序列的 PCR 扩增。

(2) PCR 扩增体系

PCR 扩增体系见表 1。

(3) PCR 扩增条件

Step 1: 预变性: 94 $^{\circ}$ C, 10 min;

Step 2: $\times 30$ 循环: 变性, 94 $^{\circ}$ C, 30 s; 复性: 60 $^{\circ}$ C, 1 min; 延伸: 72 $^{\circ}$ C, 1 min;

Step 3: 延伸: 72 $^{\circ}$ C, 10 min。

表 1 PCR 扩增引物

Table 1 Components of the mixture used for PCR amplification

试剂	用量/ μ L
premix Taq 酶	25
上游引物 (20 μ mol/L)	1
下游引物 (20 μ mol/L)	1
模板 DNA (200 ng/ μ L)	1
无菌水	22
总体积	50

1.2.4.5 26S rRNA 基因 PCR 产物的纯化

参照 Omega Bio-tek 公司 PCR 产物纯化试剂盒说明书。

1.2.4.6 26S rRNA 基因的测序

26S rRNA 基因序列测定由上海英骏公司完成。

1.2.4.7 26S rRNA 基因序列相似度分析

将测序后的 26S rRNA 基因序列通过 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/> 网页中的比对程序进行同源性分析。

1.2.4.8 基于 26S rRNA 基因序列的系统发育分析

利用 Clustalx1.8, MEGA 5.0 软件, 根据 26S rRNA 基因序列相似度分析的结果, 选取相关菌株的 26S rRNA 基因序列, 分别采用 neighbor-joining (邻位相接法, NJ) 算法得到相应的系统发育树。

1.2.5 鲁氏酵母 A 发酵生长产酶特性初步研究

将 YEPD 液体培养基中培养好的鲁氏酵母 A 以 5% 的接种量接入发酵培养基 (不加琼脂, 其他成分同 β -1,3 葡聚糖酶平板鉴定培养基) 在 28 $^{\circ}$ C, 180 r/min 培养, 周期取样, 测量菌体生物量 (干重) 和酶活力、pH (DELTA 320 pH 计测定) 和葡萄糖含量 (生物传感仪测定)。

1.2.5.1 生物量 (干重) 测定

取 8 mL 发酵液, 立即于 4 $^{\circ}$ C 的冷冻离心机, 8000 r/min 离心 10 min, 沉淀放在 105 $^{\circ}$ C 烘箱中, 烘至恒重, 得菌体干重。

1.2.5.2 酶液的制备

分别取 8 mL 发酵液, 立即于 4 $^{\circ}$ C 的冷冻离心机, 8000 r/min 离心 10 min, 上清分别用于葡萄糖测定和作为粗酶液测定酶活力。

1.2.5.3 酶活力测定样品处理方法

实验组样品处理: 分别取 40 $^{\circ}$ C 的恒温水浴中预热 15 min 的 0.10% 的 β -1,3-1,6-葡聚糖悬浮液 4 mL 和 40 $^{\circ}$ C 的恒温水浴中预热 10 min 的酶液 4 mL, 混匀于 40 $^{\circ}$ C 的恒温水浴中反应 15 min。(反应 5 min 左右震荡一次) 反应结束后 5000 r/min 离心 10 min。收集上清

于 10 mL 的比色管中, 加入 0.38 mL 的 DMSO, 再用 pH 为 5.50 的 0.10 mol/L 的乙酸缓冲溶液定容至 10 mL, 即得实验组样液, 用于实验。

其中对照组样品处理中用 pH 为 5.50 的 0.10 mol/L 的乙酸缓冲溶液代替 0.10% 的 β -1,3-1,6-葡聚糖悬浮液 4 mL, 其他同实验组样品处理, 最后直接 pH 为 5.50 的 0.10 mol/L 的乙酸缓冲溶液定容至 10 mL, 即得对照组样液, 用于实验。

两组样液中的三股螺旋结构 β -葡聚糖含量测定采用刚果红分光光度法^[10]。

β -葡聚糖酶活单位定义为: 在上述测定条件下, 每分钟从底物溶液中降解释放 1 μ g 三股螺旋结构 β -葡聚糖所需要的酶量为 1 个酶活单位, 简称 U.)

1.2.6 数据分析

所得实验数据均为最少三次平行实验的平均值 \pm 标准偏差。

2 结果与分析

2.1 耐盐酵母菌的分离、纯化及产 β -葡聚糖酶的定性实验

将辣椒酱的稀释液涂布在 NaCl 浓度为 18% 的 YEPD 平板 (含 2% 琼脂) 上, 能在该平板上长出的菌株为高耐盐的菌株, 再根据酵母的形态特征和出芽生殖特征来作为筛选酵母的依据。得到一株耐盐酵母菌株, 命名为 A。

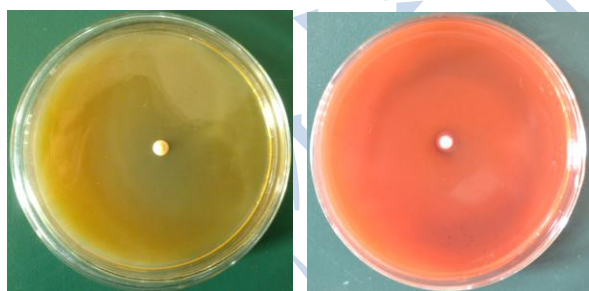


图 1 菌株 A 在鉴定平板的刚果红溶液染色前 (左) 和刚果溶液染色后 (右)

Fig.1 Images of growth of strain A on Congo red agar plate (before [left] and after [right] staining with Congo red)

基于 Fleet 等^[11]报道: 酵母菌处于葡萄糖限制生长状态时, 均会产生 β -葡聚糖酶以及刚果红能与 β -葡聚糖大分子偶联成红色化合物^[12], 菌株分泌产生的 β -葡聚糖酶能降解培养基中 β -1,3-1,6-葡聚糖, 引起菌落周围的 β -1,3-1,6-葡聚糖分子量降低而无法与刚果红形成稳定的络合物, 经 0.90% 的生理盐水洗涤后, 平板上呈现透明圈, 其透明圈的大小与菌株的 β -1,3 葡

聚糖酶活性成正比。采用 β -1,3 葡聚糖酶鉴定平板 (刚果红染色法) 对 A 菌进行的产酶定性筛选实验结果如图 1 所示。

从图 1 可以看出: 刚果红鉴定平板的耐盐酵母 A 菌落周围产生了明显的清晰透明圈, 说明耐盐酵母 A 具有一定的产生、分泌胞外 β -1,3-葡聚糖酶的能力。

2.2 耐盐酵母 A 对氯化钠耐受性生长曲线绘制

按照 1.2.3 的方法, 以培养时间 (h) 为横坐标, OD₆₀₀ 为纵坐标作图, 得到耐盐酵母 A 在 12~24% NaCl 浓度下的生长曲线。结果如图 2 所示。

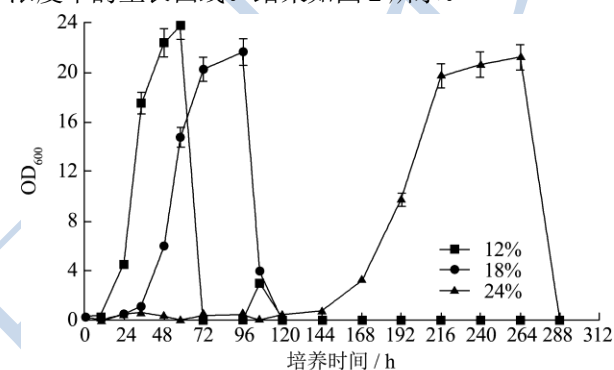


图 2 菌株 A 在培养基 B 中 (含 12~24% NaCl) 发酵生长曲线
Fig.2 Growth curve of strain A in medium B containing 12%~24% NaCl

如图 2 所示: 在含 12%、18% 和 24% NaCl 的培养基 B 中, 菌株 A 分别经 10 h、24 h 和 144 h 的适应期后能稳定生长 48 h、72 h 和 120 h, 24% NaCl 浓度条件下其最大生物量仅比前两者低了 12.37% 和 1.98%。不难发现随着培养基 B 中 NaCl 浓度的增菌株 A 的适应期明显延长, 稳定生长的时间显著增加, 而最大生物量仅是稍稍下降。说明: 24% NaCl 浓度的生长逆境对菌株 A 来说能够耐受, 同时确定耐盐酵母 A 是一株高耐盐酵母。

2.3 26S rRNA 基因序列分析

2.3.1 菌株 A 26S rRNA 基因序列 PCR 电泳图

由菌株 A 的 PCR 电泳图 3 可以看出, A 菌 26S rRNA 基因序列在 582 bp。

2.3.2 菌株 A 26S rRNA 基因序列

通过分子生物学的手段鉴定该菌株的 ITS 核苷酸序列如下:

AAACCAACCGGGATTGCCTTAGTaACGGCG
AGTGAAGCGGCAAAAGCTCAAATTTGAAATCTG
GTACCTTTCGGTGCCCGAGTTGTAATTTGGAGAA

AGTGATTCTGGGACTGGCCCTTGCCATGTTCCCT
 TGGAACAGGACGTCATAGAGGGTGAGAACCCC
 GTGAGGCGAGGTGATCCAGTTCTTTGTAGAACG
 CTTTCGAAGAGTCGAGTTGTTTGGGAATGCAGC
 TCTAAGTGGGTGGTAAATTCATCTAAAGCTAAA
 TACAGGCGAGAGACCGATAGCGACAAGTACAG
 TGATGGAAAGATGAAAAGAACTTTGAAAAGAG
 AGTGAAAAAGGACGTGAAATGTTGAAAGGGA
 AGGGCATTTGATCAGACATGGTGTTTTGTGCCCC
 TCGCTCCTCGTGGGTGGGGGAATCTCGCAGCTC
 ACTGGGCCAGCATCAGTTTTGGCGGCAGGATAA
 ATCTCTGGGAATGTGGCTTCTTCTTCGGGAGGG
 AGTGTTATAGCCCAGGGGAATACTGCCAGCTGG
 GACTGAGGTATGCGACATTTTGTCAAGGATGTTG
 GCATAATGGTTATATGCCGCC

2.3.3 菌株 A 的 26s rRNA 基因发育树

菌株 A 的 26s rRNA 基因序列 (582 bp) 和 BLAST 比对结果显示它与 *Zygosaccharomyces rouxii* strain

NRRL Y-229 菌的 26s rRNA (JQ689016) 有 100% 的相似度。构建的系统发育树 (图 4) 表明菌株 A 在 *Zygosaccharomyces* 属进化树一个分枝上, 与 *Z. Rouxii* 种的菌株在一个类群内而与其他种处于不同的分枝。因此, 该菌株为鲁氏酵母接合菌株, 并保藏在中国典型培养物保藏中心, 保藏号为: CCTCC M 2013310。

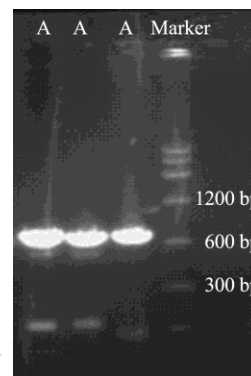


图 3 菌株 A 的 PCR 电泳图

Fig.3 PCR electropherogram of strain A

表 2 菌株 A 的 26s rRNA 基因测序 BLAST 结果

Table 2 BLAST results for 26S rRNA gene sequencing of strain A

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Max ident	Accession
<i>Zygosaccharomyces rouxii</i> strain NRRL Y-229 26s ribosomal RNA gene, partial sequence	1075	1075	100%	0.0	100%	JQ689016

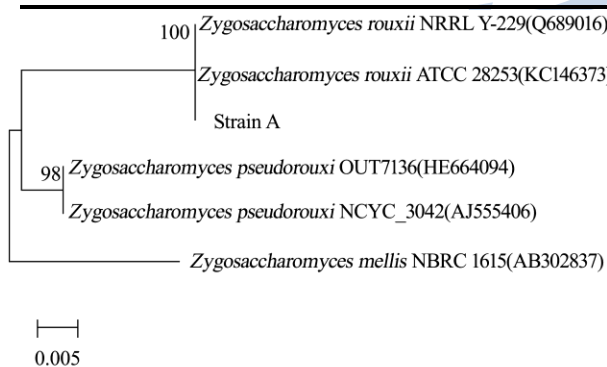


图 4 菌株 A 基于 26s rRNA 基因发育树图

Fig.4 26S rRNA gene-based phylogenetic tree of strain A

2.4 鲁氏酵母 A 发酵生长产酶特性初步研究

将 YEPD 培养基中培养好的鲁氏酵母 A 以 5% 的接种量接入发酵培养基 (不加琼脂, 其他成分同 β -1,3 葡聚糖酶平板鉴定培养基) 在 28 °C, 180 r/min 培养, 周期取样, 测菌体干重、 β -1,3 葡聚糖酶活、pH 和葡萄糖浓度。实验结果如图 5、图 6 所示。

由图 5、图 6 可知: *Z. Rouxii* A 发酵培养过程中出现了两次二次生长现象, 其生物量 (干重) 分别在 12 h (6.10 g/L)、24 h (9.35 g/L) 和 48 h (11.94 g/L) 达到峰值。*Z. Rouxii* A 生长过程中发酵液 pH 随着培

养时间的增加先下降 (至 21 h) 后上升 (培养结束), 其最低值为 5.67。发酵后期细胞自溶 (48 h 后) 使 pH 持续升高。另外, 发酵液中葡萄糖浓度在 21 h 达到了低点, 之后葡萄糖浓度维持在 1.57 g/L 左右。

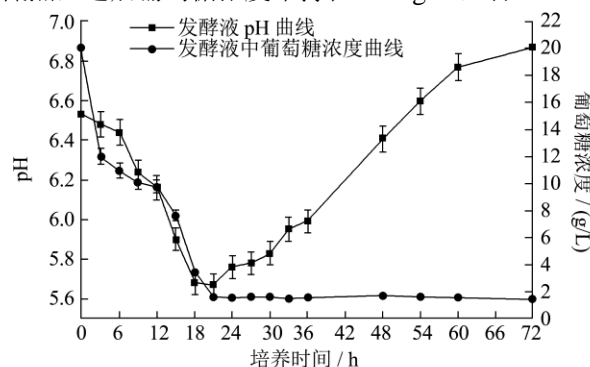


图 5 *Z. Rouxii* A 发酵过程中发酵液 pH 和葡萄糖浓度曲线

Fig.5 *Z. rouxii* A growth curve showing glucose concentrations at varying pH values of the fermentation broth

Z. Rouxii A 在 24 h 和 48 h 的生物量 (干重) 分别为 9.35 g/L 和 11.94 g/L, 分别比 18 h 的 6.38 g/L 提高了 46.55% 和 87.15%, 而 21 h 后葡萄糖浓度仅维持在 1.57 g/L 左右, 表明: *Z. Rouxii* A 生长过程中合成、分泌的 β -葡聚糖酶持续降解 β -1,3-1,6-葡聚糖, 并为其二次生长提供了碳源和能源。我们在对球拟酵母发酵培

养的研究中^[13]发现:球拟酵母在生长过程中将葡萄糖转化为胞内的海藻糖和甘油,并在后期作为储备碳源和能源物质诱导相关酶系合成并满足细胞生长需求。那么,鲁氏酵母A菌的发酵过程中可能也存在类似的综合生理现象,即:几大酶系(海藻糖利用酶系、甘油利用酶系、葡聚糖酶系)在葡萄糖基本耗尽后合成启动,以利用相关的存在于培养体系内的底物。由于本文仅对鲁氏酵母A菌发酵生长产酶特性进行了初步的研究(如:文中已测定了葡聚糖酶的变化趋势(图6)。具体其它酶系的合成与相关底物的利用情况,将是我们下一步系统研究的目标。

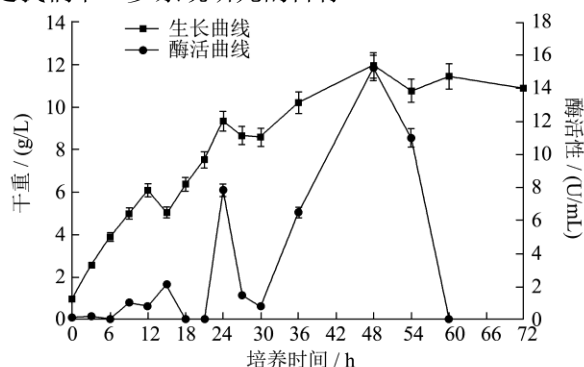


图6 *Z. Rouxii A* 发酵过程中的生物量和 β -1,3-葡聚糖酶活性曲线

Fig.6 *Z. rouxii A* growth curve showing biomass yield and β -1,3-glucanase activity

另一个有趣的现象是:*Z. Rouxii A*的 β -1,3-葡聚糖酶活性曲线与生长曲线基本趋势一致,最大酶活性伴随着菌体自溶(12 h、24 h和48 h)而迅速降低,并分别在12 h、24 h和48 h其生物量出现峰值时也达到了峰值,48 h达到酶活最高值15.23 U/mL。说明:*Z. Rouxii A*的 β -1,3-葡聚糖酶生物合成与细胞生长偶联。这为下一步研究:高密度发酵产 β -1,3-葡聚糖酶解决了一个基本问题:即先高密度发酵再诱导相产酶的双相发酵模式不适合本菌株合成 β -1,3-葡聚糖酶,应该是高密度发酵过程中诱导产酶模式,而且发酵终点前应加强细胞密度检测,一旦出现细胞自溶,应立即放罐。*Z. Rouxii A*这种产 β -1,3-葡聚糖酶的模式更适用于现行的发酵功能酿造食品(面包、酱油、白酒、醋、发酵奶制品等)的工艺,为通过优化工艺提高食品中功能 β -1,3-1,6-葡聚糖的含量、提高产品品质提供了可能和保证。

3 结论

从湖北农家自制的辣椒酱中分离纯化得到了一株耐盐酵母,通过 β -1,3-葡聚糖酶鉴定(刚果红染色法)确定其具有合成、分泌胞外 β -1,3-葡聚糖酶特性。NaCl

耐受性研究确定该菌株具有高耐盐性,能经144 h的适应期后在24% NaCl的培养基B中稳定生长120 h。运用26S rRNA序列分析鉴定该菌株为鲁氏酵母。对其酶产量进行的初步研究发现:液体培养48 h酶活可以达到15.23 U/mL。经液体发酵培养确定该菌株的 β -1,3-葡聚糖酶生物合成与细胞生长偶联。这些研究确定:该菌株为产 β -葡聚糖酶的高耐盐鲁氏酵母,该菌株在酿造食品中的运用可提高功能性 β -1,3-1,6-葡聚糖的含量,从而填补该类产品的市场空缺,并提高产品市场竞争力。

参考文献

- [1] WANAKHACHORNKRAI P, LERTSIRI S. Comparison of determination method for volatile compounds in Thai soy sauce [J]. Food Chem, 2003, 83: 619-629
- [2] Michael J, Janine H V. Growth of the saltolerant yeast *Zygosaccharomyces rouxii* in microtiter plates: effects of NaCl, pH and temperature on growth and fusel alcohol production from branched-chain amino acids [J]. FEMS Yeast Research, 2003(3): 313-318
- [3] Zhang Y F, Tao W Y. Flavor and taste compounds analysis in Chinese solid fermented soy-sauce [J]. Afr. J. Biotechnol., 2009, 8: 673-681
- [4] 郑聃,付畅,戴绍军,等.盐胁迫下酿酒酵母和鲁氏酵母渗透调节方式的对比与分析[J].哈尔滨师范大学:自然科学学报, 2007,123:91-95
ZHENG Dan, FU Chang, DAI Shaojun, et al. Contrast and analysis of osmotic regulation of *Saccharomyces cerevisiae* and *Zygosaccharomyces rouxii* under salt stress [J]. Journal of Harbin Normal University: Natural Science Journal, 2007, 123: 91-95
- [5] 徐希柱,樊祥东.啤酒酵母细胞壁中 β -(1,3)-D-葡聚糖提取与应用[J].粮食与油脂,2008,3:41-43
XU Xi-zhu, FAN Yang-dong. The extraction and application of β -(1,3)-D-glucan from beer yeast cell walls [J]. Journal of Grain and Oil, 2008, 3: 41-43
- [6] Fen Qin, Finn L Aachmann, Bjorn E Christensen. Chain length distribution and aggregation of branched (1 \rightarrow 3)- β -D-glucans from *Saccharomyces cerevisiae* [J]. Carbohydrate Polymers, 2012, 90: 1092-1099
- [7] WANG Cheng long, et al. Progress on Preparation and Application of Water-soluble Yeast Glucan [J]. Progress in Veterinary Medicine, 2010, 12: 128-131
- [8] 杜连祥,路福平.微生物学实验技术[M].北京:中国轻工业出版社,2006

- DU Lianxiang, LU Fuping. Experimental technique in microbiology [M]. Beijing: China Light Industry Press, 2006
- [9] Bartlett G R. Phosphorus assay in column chromatography [J]. J. Biol. Chem., 1958, 234: 466-468
- [10] 王志, 谢婷, 李冬芝, 等. 酵母三股螺旋结构 β -葡聚糖测定方法研究[J]. 现代食品科技, 2014(accepted)
- WANG Zhi, XIE Ting, LI Dongzhi, et al. Investigation on the measurement of yeast β -glucan with triple helix structure [J]. Modern Food Science and Technology, 2014(accepted)
- [11] Fleet G H. Cell walls. In: Rose AH, Harrison JD, editors. The yeasts, vol. 4. London: Academic Press; 1991, p. 199-277
- [12] 李春磊, 任海霞, 王瑞明, 等. 产 β -葡聚糖酶高产菌株的驯化及筛选[J]. 现代食品科技, 2006, 1: 4-9
- LI Chunlei, REN Haixia, WANG Ruiming, et al. The Acclimatization and Selection of Strain Containing Abundant β -Glucanase [J]. Modern Food Science and Technology, 2006(1): 4-9
- [13] Xiong Chen, Mei Yan, Fuli Xie, et al. Biotin enhances salt tolerance of *Torulopsis mogii* [J]. Ann. Microbiol., 2014, DOI 10. 1007/s13213-014-0871-6