

葡萄酒乳杆菌的分离鉴定

但霞, 刘树文, 吕珍, 朱成龙

(西北农林科技大学 葡萄酒学院, 陕西 杨凌 712100)

摘要:使用 ATB 和 MRS 2 种培养基对自然启动苹乳发酵葡萄酒进行乳酸菌的分离鉴定, 生化鉴定和 16S rRNA 测序。结果表明:分离到的菌株为短乳杆菌、植物乳杆菌和马里乳杆菌。这是国内首次从葡萄酒中分离到马里乳杆菌, 说明我国的葡萄酒乳酸菌种类丰富。

关键词:葡萄酒; 苹乳发酵; 乳酸杆菌; 马里乳杆菌

中图分类号:TS 262.6 **文章标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2012)21-0089-03

葡萄酒在酒精发酵结束之后还可能会启动二次发酵, 即葡萄酒的苹乳发酵, 该过程将葡萄酒中的苹果酸转化为乳酸, 能够改善葡萄酒的口感, 并且形成更多香气物质, 对葡萄酒的品质有较大的提升^[1]。苹乳发酵是由乳酸菌完成的, 参与发酵的乳酸菌主要属于酒球菌(*Oenococcus*)、乳杆菌(*Lactobacillus*)、片球菌(*Pediococcus*)和明串珠菌(*Leuconostoc*) 4 个属, 其中酒球菌因为其良好的发酵特性一直被认为是最佳的苹乳发酵菌株, 因而国内对于酒球菌的研究较多。而有研究表明乳杆菌等葡萄酒乳酸菌对于葡萄酒苹乳发酵有重要意义, 特别是乳杆菌所产生的乳杆菌酸可提高酒球菌细胞膜耐受能力, 提高苹乳发酵启动的概率, 对苹乳发酵的启动有推动作用^[2]。该文针对葡萄酒乳酸杆菌进行了分离鉴定。

1 材料与方法

1.1 试验材料

酒样: 新疆产区, 赤霞珠, 2010 年。培养基: ATB, MRS。试剂: 16S rRNA 通用引物编号 27F 和 1492, 由上海桑尼生物合成; 放线菌酮, dNTP, 索莱宝公司; *Taq* 酶 Fermentas(MBI); 生化试剂, 天津博迪等。仪器与设备: Gene Amp PCR system 2700 型 PCR 仪, 美国 ABI 公司; Eppendorf Centrifuge 5417R 型冷冻离心机, 德国 Eppendorf 公司; 电泳设备和凝胶成像系统, 北京科普仪器厂; 霉菌恒温培养箱, 上海跃进仪器厂。

第一作者简介:但霞(1986-), 女, 硕士, 研究方向为酿酒微生物。E-mail: dxfreedom@126.com。

责任作者:刘树文(1965-), 男, 博士, 教授, 研究方向为酿酒微生物。E-mail: liushuwen@nwsuaf.edu.cn。

基金项目:现代农业产业技术体系建设专项资金资助项目(nycytx-30-ch-03); 农业部“948”科研资助项目(2009Z29)。

收稿日期:2012-06-08

1.2 试验方法

1.2.1 菌株分离 取酒样 1 mL 分别接种于 10 mL 含有 50 mg/L 放线菌酮的 ATB 和 MRS 液体培养基中, 待培养基变浑浊, 涂板于含有 50 mg/L 放线菌酮的 ATB 和平板培养基, 28℃ 培养 2 d 以上, 待长出菌落后, 挑取接触酶阴性单菌落液培, 划线纯化后培养, 40% 甘油-20℃ 保藏待用。

1.2.2 生化鉴定 可发酵糖试验, 选取阿拉伯糖、纤维二糖、果糖、半乳糖、葡萄糖、葡糖酸盐、乳糖、麦芽糖、甘露醇、甘露糖、松三糖、蜜二糖、棉籽糖、鼠李糖、核糖、山梨糖、蔗糖、海藻糖、木糖等 18 种糖作为反应碳源, 培养基根据《乳酸细菌分类鉴定及实验方法》^[11] 配制。

1.2.3 分子鉴定 DNA 提取: 用 CTAB 法提取菌株总 DNA^[7], 5 μL 上样至 1% 的凝胶电泳检测。PCR 反应体系: 10 ng 模板 DNA, dNTP 1.6 μL (2.5 mmol/L), MgCl₂ 1.6 μL (25 mmol/L), 上下游引物各 1 μL (10 μmol/L), *Taq* 酶 0.1 μL (5 U/μL), 10×buffer 2 μL, 加灭菌去离子水至 20 μL; 反应条件: 4℃ 预变性 2 min, 94℃ 变性 45 s, 64℃ 退火 2 min, 72℃ 延伸 2 min, 30 个循环, 最后 72℃ 延伸 10 min, 反应完成后 5 μL 上样至 1% 的凝胶电泳检测, 样品送至上海生工测序。

2 结果与分析

2.1 分离及生化鉴定

从 ATB 平板培养基中共挑取到 11 个单菌落, 编号为 XJA; 从 MRS 培养基中挑取了 16 个单菌落, 将各个菌株划线纯化后保藏, 并进行可发酵糖试验, 结果见表 1。

将镜检和可发酵糖结果与《伯杰氏细菌手册》和《常用细菌系统鉴定手册》相比对, 结果表明 XJA1、XJ9、XJ13、XJ20、XJ25、XJ27、XJ30、XJ35、XJ36 其菌体椭圆或者短杆, 发酵核糖、果糖, 不发酵甘露糖, 鼠李糖, 水杨苷, 海藻糖等, 初步鉴定为短乳杆菌; XJA2、XJ12、XJ14、

XJ15、XJ16、XJ17、XJ18、XJ19、XJ21 镜检显示菌体为杆状发酵纤维二糖、果糖、半乳糖、阿拉伯糖等,不发酵鼠李糖,基本符合植物乳杆菌的鉴定特征,初步将其确定为植物乳杆菌;XJA3、XJA4、XJA5、XJA6、XJA7、XJA8、XJA10、XJA11、XJA12 9 株菌镜检显示其菌体为杆状,不发酵阿拉伯糖、乳糖、棉籽糖、蜜二糖、核糖,发酵果糖、麦芽糖、甘露糖,基本符合鉴定手册中对马乳杆菌可发酵糖反应的描述,因此将其初步确定为马乳杆菌。

表 1 菌株可发酵糖试验结果

Table 1 Results of Carbohydrate fermentation tests

| 菌株 | 镜检 | 纤维二糖 | 果糖 | 半乳糖 | 葡萄糖 | 乳糖 | 甘露糖 | 甘露醇 | 松三糖 | 蜜二糖 | 棉籽糖 | 鼠李糖 | 核糖 | 水杨苷 | 阿拉伯糖 | 蔗糖 | 海藻糖 | 木糖 |
|-------|----|------|----|-----|-----|----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|----|-----|------|----|-----|----|
| XJA1 | 杆 | - | + | + | + | + | + | - | - | + | + | - | + | - | + | + | + | - |
| XJA2 | 杆 | + | + | + | - | + | + | + | + | + | + | - | + | + | + | + | + | - |
| XJA3 | 杆 | + | + | - | + | + | + | + | + | - | + | - | + | - | - | - | + | - |
| XJA4 | 杆 | + | + | - | + | + | + | + | + | - | + | - | + | - | - | - | + | - |
| XJA5 | 杆 | + | + | - | + | + | + | + | + | - | + | - | + | - | - | - | + | - |
| XJA6 | 杆 | + | + | - | + | + | + | + | + | - | + | - | + | - | - | - | + | - |
| XJA7 | 杆 | + | + | + | + | + | + | + | + | - | + | - | + | - | - | - | + | - |
| XJA8 | 杆 | + | + | - | + | + | + | + | + | - | + | - | + | - | - | - | + | + |
| XJA10 | 杆 | + | + | - | + | + | + | + | + | - | + | - | + | - | - | - | + | - |
| XJA11 | 杆 | + | + | - | + | + | + | + | + | - | + | - | + | - | - | - | + | - |
| XJA12 | 杆 | + | + | - | + | + | + | + | + | - | + | - | + | - | - | - | + | + |
| XJ9 | 椭 | - | + | + | + | + | + | - | - | + | + | - | + | - | + | + | + | - |
| XJ12 | 杆 | - | + | + | + | + | + | + | + | + | + | - | + | + | + | + | + | + |
| XJ14 | 杆 | + | + | + | - | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | - |
| XJ17 | 杆 | + | + | + | - | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| XJ18 | 杆 | + | - | + | + | + | + | + | + | - | + | + | + | + | + | + | + | + |
| XJ19 | 杆 | + | - | + | + | + | + | - | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| XJ21 | 杆 | + | + | - | + | - | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| XJ15 | 杆 | + | + | + | - | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| XJ16 | 杆 | + | + | + | + | + | + | - | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| XJ20 | 椭 | - | - | + | + | + | + | - | - | + | + | - | + | - | + | - | - | - |
| XJ27 | 椭 | - | + | + | + | + | + | - | - | + | + | - | + | - | + | + | - | - |
| XJ30 | 椭 | - | + | - | + | + | + | - | - | + | + | - | + | - | + | + | - | - |
| XJ35 | 椭 | - | + | + | - | + | + | - | - | + | + | - | + | - | + | + | - | + |
| XJ36 | 椭 | - | + | + | + | + | + | - | - | + | + | - | + | - | + | + | - | + |
| XJ13 | 短 | - | + | + | + | + | + | - | - | + | + | + | + | + | + | + | - | - |
| XJ25 | 短 | - | + | + | + | + | + | - | - | + | + | - | + | - | + | + | - | - |

2.2 分子鉴定

将 PCR 产物上样至 1% 凝胶电泳检测(图 1)。电泳条带清晰,大小在 1 500 bp 左右,符合乳酸菌 16S rRNA 的长度。将产物送样至上海生工测序,所得序列在 Genbank 中检索,结果表明 XJA1、XJ9、XJ13、XJ20、XJ25、XJ27、XJ30、XJ35、XJ36 为短乳杆菌,XJA2、XJ12、XJ14、XJ15、XJ16、XJ17、XJ18、XJ19、XJ21 为植物乳杆菌,XJA3、XJA4、XJA5、XJA6、XJA7、XJA8、XJA10、XJA11、XJA12 为马乳杆菌,符合可发酵糖试验的结果。这是我国首次从葡萄酒中分离到马乳杆菌,表明我国新疆产区自然启动 MLF 的葡萄酒中有丰富的乳酸菌种群。

从 2 种培养基分离菌种情况来看,ATB 培养基分离了马乳杆菌 8 株,短乳杆菌和植物乳杆菌各 1 株;

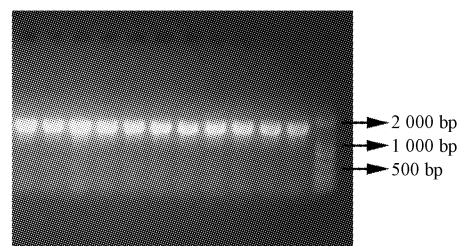


图 1 乳酸菌 16S rRNA PCR 凝胶电泳图

Fig. 1 Agarose gel electrophoreses of lactic acid bacteria 16S rRNA PCR product

MRS 培养基分离了短乳杆菌和植物乳杆菌各 8 株;证明在 ATB 培养基中马乳杆菌生长能力强于短乳杆菌和植物乳杆菌,而在 MRS 培养基中则正好相反。ATB pH 4.8, MRS 培养基的 pH 则在 6 以上,证明在酸度较低时马乳杆菌更有生长优势,但也不排除培养基成分的影响。

3 结论与讨论

3.1 乳酸菌的分离

试验采用 ATB 培养基是希望在分离乳杆菌的同时检测酒球菌生长情况,而最终分离的菌株当中没有酒球菌,这可能与其生长力较弱有关。在液体培养过程中,因为培养基中没有酒精等的抑制,乳杆菌等乳酸菌生长能力强,争夺了大部分营养,使酒球菌等长势弱的菌株无法生长,分离的菌种受到限制,这也是单独分离酒球菌时需要添加万古霉素抑制乳杆菌生长的原因^[6]。

培养基成分对于乳酸菌的生长也有较大影响,这与菌种自身的生长能力和条件有关,例如酒球菌只有在添加了番茄汁或者葡萄汁的培养基中才能生长^[6]。该试验中马乳杆菌只存在于 ATB 培养基中,说明 ATB 培养基比 MRS 更适合该菌株的生长;且从 MRS 培养基分离情况来看短乳杆菌和植物乳杆菌生长能力较之于马乳杆菌更强,相同条件下短乳杆菌和植物乳杆菌竞争力更强。

3.2 马乳杆菌

马乳杆菌是 Carr 等^[3]在 20 世纪 70 年代首次发现并命名的乳杆菌,最初是从麦芽汁制品中分离的,属于同型发酵,具有运动型;发酵 N-乙酰氨基葡萄糖,扁桃苷,熊果苷,D-纤维二糖,七叶灵,D-半乳糖产酸,发酵核糖醇,半乳糖醇,丁四醇,甘油,糖原,纤维醇,5-酮葡萄糖,α-甲基-D-甘露糖,D-松二糖不产酸^[9]。马乳杆菌基因组的 GC 含量是乳杆菌中最低的,只有 32%~34%,细胞壁中二甲基庚二酸含量也是最低的。它与山梨乳杆菌(*Lactobacillus yamanashiensis*)相似度极高,所以 Nonomura H^[8]最初将其列为山梨乳杆菌马利亚种,随后 Kaneuchi C 等^[9]将这 2 种菌株进行系统的研究,提议将

马里乳杆菌从山梨乳杆菌种中单列出来,成为独立的乳酸杆菌种。

马里乳杆菌分布广泛,常分离于肉制品,动物消化道,苹果酒,葡萄汁中,目前还未有其对发酵制品不良影响的报道,在肉制品发酵中马里乳杆菌更是被视为优良发酵菌种^[8,14-15]。国外关于葡萄酒乳酸菌的报道中也多有马里乳杆菌的存在,并且葡萄园土壤中也能分离到乳酸菌,这应该是葡萄酒中马里乳杆菌的最大来源^[9,12-13]。Couto J A等^[4]从加强型葡萄酒中分离到了一系列对酒精耐受能力强的乳杆菌,其中包括马里乳杆菌,说明该菌种对于酒精也有一定的耐受能力。但其对于葡萄酒品质提升方面的作用尚不清楚,且目前对于该菌种生理特性方面的研究也较为缺乏,还需要将其与葡萄酒香气口感等因素结合起来深入研究。

2011年 Kim D W等^[5]初步测定了马里乳杆菌 KCTC3596 菌株基因组序列,并上传到 Genbank 中供广大学者下载研究,登录编号为 BACP01000001 ~ BACP01000122。

参考文献

- [1] 张春晖,李华. 葡萄酒微生物学[M]. 西安:陕西人民出版社,2003: 113-160.
- [2] Teixeira H, Gonçalves M G, Rozes N, et al. Lactobacillic acid accumulation in the plasma membrane of *Oenococcus oeni*: a response to ethanol stress [J]. Microb Ecol, 2002, 43: 146-153.
- [3] Carr J G, Davies P A. Homofermentative Lactobacilli of Ciders including *Lactobacillus mali* nov. spec [J]. Journal of Applied Microbiology, 1970, 33 (4): 768-774.
- [4] Couto J A, Hogg T A. Diversity of ethanol-tolerant lactobacilli isolated from Douro fortified wine; clustering and identification by numerical analysis of electrophoretic protein profiles [J]. Journal of Applied Microbiology, 1994, 76(5): 487-491.
- [5] Kim D W, Choi S H, Kang A, et al. Draft Genome Sequence of *Lactobacillus mali* KCTC 3596 [J]. Journal of Bacteriology, 2011, 9: 5037.
- [6] 江志国,陶永胜. 葡萄酒酒类酒球菌分离培养基设计[J]. 宁夏农学院学报, 2004, 25(4): 94-96.
- [7] 李西柱,刘树文,王坐京. 酒球菌基因组 DNA 提取及 RAPD 反应体系的优化[J]. 酿酒科技, 2009(4): 46-50.
- [8] Nonomura H. *Lactobacillus yamanashiensis* subsp. *yamanashiensis* and *Lactobacillus yamanashiensis* subsp. *mali* sp. and subsp [J]. International Journal of Systematic Bacteriology, 1983, 33(2): 406-407.
- [9] Kaneuchi C, Seki M, Komagata K. Taxonomic Study of *Lactobacillus mali* Carr and Davis 1970 and Related Strains; Validation of *Lactobacillus mali* Carr and Davis 1970 over *Lactobacillus yamanashiensis* Nonomura 1983 [J]. International Journal of Systematic Bacteriology, 1988, 38(3): 269-272.
- [10] 东秀珠,蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册[M]. 北京:科学出版社,2001.
- [11] 凌代文,东秀珠. 乳酸菌分类鉴定及实验方法[M]. 北京:中国轻工业出版社,1999.
- [12] Rodas A M, Ferrer S, Pardo I. Polyphasic study of wine *Lactobacillus* strains; taxonomic implications [J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2005, 55: 197-207.
- [13] Manes-Lazaro R, Ferrer S, Rossello-Mora R, et al. *Lactobacillus oeni* sp. nov., from wine [J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2009, 59: 2010-2014.
- [14] 史怀平. 朱鹮消化道正常菌群的分离鉴定及微生态制剂的研究[D]. 杨凌:西北农林科技大学,2005.
- [15] 董彩文,毛多斌,白燕红,等. 产广谱细菌素马里乳杆菌菌株的筛选和鉴定[J]. 食品科技, 2009, 34(4): 21-24.

Isolation and Identification of Wine *Lactobacillus*

DAN Xia, LIU Shu-wen, LV Zhen, ZHU Cheng-long

(College of Enology, Northwest Agricultural and Forestry University, Yangling, Shaanxi 712100)

Abstract: Wine lactic acid bacteria was the strain carried out malolactic fermentation, in which the *Lactobacillus* had the most species. Isolated and identified lactic acid bacteria from wine which had malolactic fermented spontaneously with culture of ATB and MRS, biochemical identification and 16S rRNA sequencing. The results showed that the isolated strains were *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus mali*. This was the first time isolated *Lactobacillus mali* from domestic wine, and it suggested there was a wide variety of wine lactic acid bacteria in our country.

Key words: wine; malolactic fermentation; *Lactobacillus*; *Lactobacillus mali*