

酒曲中生香酵母的分离及生理生化鉴定

陆振群

(安徽工程大学生物与化学工程学院,安徽 芜湖 241000)

摘要: 从酒曲中筛选出 11 株生香酵母,并对其形态及生理生化特性进行研究,确定其种属。筛出菌后进行发酵测发酵液中总酯含量,选出高产优质菌株。在 11 株产酯酵母中,产酯最高的菌株是 X7,其发酵液总酯含量达到 1.78 g/L。

关键词: 微生物; 生香酵母; 分离鉴定; 总酯

中图分类号: Q93-3; TS261.1; TS262.3

文献标识码: A

文章编号: 1001-9286(2012)03-0037-03

Isolation of Aroma-producing Yeast from Starter and Its Physiological and Biochemical Identification

LU Zhenqun

(College of Biological and Chemical Engineering, Anhui Polytechnic University, Wuhu, Anhui 241000, China)

Abstract: 11 aroma-producing yeast strains were isolated from wine starter and their morphological, physiological and biochemical properties were studied and their species were determined. Then high yield quality strains were screened out through measuring total esters content in broth fermented by those yeast strains. Among all 11 yeast strains, strain X7 had the highest yield of esters and total esters content in its fermenting liquid was as high as 1.78 g/L.

Key words: microbes; aroma-producing yeast; isolation and identification; total esters

生香酵母又称为产酯酵母,主要属于产酯酵母和假丝酵母,它是中国白酒中酯香的主要产生菌^[1]。生香酵母能够以乙醇为碳源,既具备酒精发酵能力又具备醋酸发酵能力,能够产生以酯香为主的多种香味物质。其可以以糖、醛、有机酸、盐类为养料,在酯酶作用下合成酯类^[2]。生香酵母适用于各种白酒的生产,其主要作用是产酯(乙酸乙酯)增香,除杂味,使酒体协调,改善白酒质量。因此,从浓香型酒曲、酱香型酒曲中分离出生香酵母,并进一步提升生香酵母的产酯能力和优化各种酯的组成比例,酿造出酯香更浓的美酒,对提高酒的品质非常意义。

1 材料与方法

1.1 研究材料

白酒酒曲,无锡某酒厂提供。

1.2 培养基

1.2.1 富集培养基

麦氏培养基:0.1%葡萄糖,0.18%氯化钾,0.25%酵母膏,0.82%醋酸钠,2%琼脂(麦氏培养液不需),以蒸馏水配制,113℃灭菌 30 min。

1.2.2 筛选培养基

YPD 培养基:2%葡萄糖、2%蛋白胨、1%酵母浸膏、2%琼脂、蒸馏水配制。

1.2.3 鉴定培养基

PDA 培养基:20%马铃薯、2%蔗糖、2%琼脂、蒸馏水配制、自然 pH 值。

玉米粉培养基:向 60 g 玉米粉中先加入少量水调成糊状,再逐渐加水至 1000 mL,搅匀后以 80~90℃水浴 1.5 h 后过滤(中间搅拌 3~4 次),滤液补加水至 1000 mL,加琼脂 15 g,加热融化后趁热用脱脂棉过滤,分装到试管和三角瓶内,0.07 MPa 灭菌 30 min。

尿素培养基^[3]:蛋白胨 0.1 g、氯化钠 0.5 g、磷酸二氢钾 0.2 g、尿素 0.2 g(或 10% 2 mL)、葡萄糖 0.01 g(或 10%葡萄糖 0.1 mL)、蒸馏水 100 mL、酚红(0.2%) 0.4 mL、琼脂 2%。除尿素外把其他药品称好放入水中煮沸,使之溶解,调 pH7.2 过滤,121℃高压灭菌 30 min。

配制尿素(灭菌)液:每 100 mL 基液内加 2 mL。

1.2.4 发酵产酯培养基

豆芽汁培养基(液):10%豆芽汁、0.5%葡萄糖,蒸馏水调配,自然 pH 值。

1.3 生香酵母的分离方法

收稿日期:2011-12-05

作者简介:陆振群(1988-),女,硕士,安徽青阳人,专业:农产品加工与贮藏。

1.3.1 生香酵母的初筛

把所选的酒曲均匀研成粉末并称取 5 g 加 100 mL 无菌水制成悬液。取 1 mL 加入到 9 mL 麦氏培养液试管中, 28 ℃ 摇床培养 24 h。再取 1 mL 接种到另一支试管中培养。经过 3~4 次的转接培养即可。

1.3.2 酵母菌的分离复筛

取富集培养酵母液, 按 10 倍梯度稀释到 10^{-6} , 取稀释度为 10^{-2} 、 10^{-3} 、 10^{-4} 、 10^{-5} 各 0.1 mL 的溶液, 分别涂布于加 60 mL/L 的硫酸链霉素的 YPD 培养平板于 28 ℃ 培养 48 h。观察菌落形态, 选定疑似酵母菌落反复进行平板划线分离和镜检, 再分离纯化酵母。挑取酵母菌落到 PDA 斜面, 28 ℃ 培养 48 h 备用。

1.4 酵母菌的鉴定^[4]

1.4.1 形态学鉴定

1.4.1.1 菌落特性的观察^[5]

将被检菌用稀释平板法在 PDA 琼脂培养基上 28 ℃ 培养 36 h, 选取单个菌落观察其颜色、形状、透明度、光滑、湿润和边缘整齐等特征。

1.4.1.2 细胞形态的观察^[6]

将待检菌接种到 PDA 斜面培养基上, 于 28 ℃ 培养 24 h。在载玻片上滴加一滴吕氏美兰染液, 无菌操作, 用接种环挑取少许菌体置于染液中, 混合均匀并盖上盖玻片。3 min 后在显微镜下观察。

1.4.1.3 假菌丝的形成^[6]

将待检菌接种于玉米粉琼脂平板 28 ℃ 培养, 观察假菌丝的有无及形态。

1.4.1.4 子囊孢子的观察^[7]

将待检菌接种于麦氏培养基(醋酸钠琼脂培养基)斜面上, 28 ℃ 培养 7 d 后, 用接种环挑取少许生长在葡萄糖-醋酸盐培养基上的酿酒酵母于载玻片上, 制成涂片, 干燥、固定。用孔雀绿芽孢染液进行染色, 无需加热, 晾干后在油镜下观察子囊孢子。

1.4.2 生理生化鉴定

1.4.2.1 糖发酵试验^[8]

酵母先在 25 ℃ 下用氮源基础培养基饥饿培养 3 d, 制备碳源饥饿酵母, 按 2.5 % 接种到 12.5 % 豆芽汁中(加 20 g/L 葡萄糖), 28 ℃ 发酵 2 周, 每天观察产气情况。

1.4.2.2 硝酸盐利用试验^[9]

酵母先在 25 ℃ 下用碳源基础培养液培养 5~7 d, 制备氮源饥饿酵母, 稀释涂布平板法在碳源基础培养基(含 20 g/L 琼脂粉)平板上涂布, 点少量硝酸盐在平板上, 25 ℃ 培养 2~3 d, 所点试剂处或周围有酵母菌落生长, 即为阳性反应。

1.4.2.3 产类淀粉化合物测定试验^[9]

将酵母接种于蛋白胨酵母膏葡萄糖 (PYD) 培养液中, 28 ℃ 培养后加入 1 滴 Lugol's 碘液, 呈蓝色、紫色或绿色则为阳性, 表示生成了类淀粉化合物。

1.4.2.4 脲酶实验^[9]

在水解尿素试验的琼脂斜面上, 于 28 ℃ 培养酵母 5~7 d, 呈淡红色, 表明能分解尿素为阳性。

1.5 发酵

无菌条件下, 将在 PDA 斜面培养基上保存的酵母菌, 接种于 10 mL 的灭菌 PDA 培养液试管中, 28 ℃ 培养 24 h, 活化。将活化后的 PDA 液体试管菌种按约 4 % 的接种量接入装有 80 mL 豆芽汁发酵液的小三角瓶中, 28 ℃ 培养 3~4 d。

2 结果与讨论

2.1 酵母菌的分离与纯化

通过富集培养和在 YPD 琼脂平板和 PDA 琼脂平板上经过多次筛选分离后, 共分离出 15 株酵母菌(菌落编号 X1~X15)。

2.2 酵母菌的鉴定

2.2.1 酵母菌菌落形态和显微形态观察

分离得到的 15 株酵母菌经菌落形态和细胞形态观察, 可将其分为 4 类。其菌落形态描述见表 1, 其细胞形态描述见表 2。

表 1 酵母菌菌落形态描述

项目	I 类	II 类	III 类	IV 类
颜色	红色	白色	乳白	乳白
形状	圆形	圆形	圆形	圆形
中央	凸起	凸起	凸起	平整
边缘整齐度	整齐	整齐	整齐	整齐
表面	湿润光滑	湿润光滑	湿润光滑	湿润粗糙
光泽度	有光泽	有光泽	有光泽	无光泽
是否透明	不透明	透明	不透明	不透明
是否粘稠	粘稠	粘稠	粘稠	粘稠

表 2 酵母菌细胞形态描述

菌类	大小	形状	子囊孢子	假菌丝
I 类	大小均匀	圆形或卵圆形	无	无
II 类	大小均匀, 生长缓慢	圆形	有	无
III 类	大小均匀	圆形或卵圆形	无	无
IV 类	大小均匀	卵圆形	有	无

2.2.2 酵母菌生理生化特性结果

对分离酵母进行生理生化特性试验, 其结果见表 3。

表 3 酵母菌生化特性

菌株类别	香味	子囊孢子	硝酸盐利用	产类淀粉物质	葡萄糖发酵	脲酶试验
I 类	无	无	-	-	+	-
II 类	有	有	+	-	+	-
III 类	有	无	-	-	+	-
IV 类	无	有	-	-	+	-

注: + 为阳性; - 为阴性。

根据《酵母菌特征及鉴定手册》介绍的方法^[10],酵母菌的鉴定主要以形态学特征为主,并结合生理学特征。形态观察包括细胞形态子囊孢子的形成及其形态、假菌丝的形成。I类酵母菌属于红酵母属(*Rhodotoruca*),II类酵母菌属于汉逊酵母属(*Hansenula*),III类酵母菌属于酒香酵母属(*Brettanomyces*),IV类酵母菌属于酵母属(*Saccharomyces*)。

2.3 总酯测定^[11]

准确吸取 25.00 mL 发酵液于 250 mL 锥形瓶中,加入 25 mL 水,滴 2 滴酚酞指示剂,用 0.1 mol/L NaOH 标准溶液滴定至微红色,记下消耗 NaOH 溶液的体积;将此滴定后的发酵液转移至 250 mL 圆底烧瓶中,准确加入 15.00 mL 0.1 mol/L NaOH 标准溶液,接上冷凝管,于沸水浴中回流皂化 0.5 h,取下冷却至室温,完全转移至 250 mL 碘量瓶中,立即用 0.1 mol/L HCl 标准溶液滴定至微红色刚好消失,记录 HCl 标准溶液用量,计算发酵液中总酯的含量,见表 4。

表 4 酵母发酵总酯

项目	菌株编号	发酵前 pH 值	发酵后 pH 值	总酯(g/L)
II 类酵母	X1	6.36	5.38	1.27
	X2	6.36	5.89	0.89
	X3	6.36	5.21	1.39
	X4	6.36	5.54	1.06
	X5	6.36	5.42	0.84
III 类酵母	X6	6.36	5.25	0.72
	X7	6.36	5.0	1.78
	X8	6.36	5.10	0.97
	X9	6.36	5.46	0.63
	X10	6.36	5.94	1.18
	X11	6.36	4.93	0.55

由表 4 可知,在相同温度和发酵时间条件下,酵母菌株 X1、X3、X7、X10 的产酯能力较强,且发酵液澄清,发酵性状稳定,是比较理想的生香酵母。I 类、IV 类酵母菌无产酯能力。

3 结论与展望

从酒曲中筛选出 15 株酵母,共分为 4 类(I、II、III、IV),其中的 II 类、III 类共 11 株酵母是产酯酵母,经过形态、生理生化特性鉴定,分别属汉逊酵母属和酒香酵母属,并对其产酯能力进行测定,在 11 株产酯酵母中,产酯最高的菌株是 X7,其发酵液总酯含量达到 1.78 g/L。

生香酵母是白酒、米酒、黄酒等酒类发酵产香的主要菌种,其不仅广泛应用于发酵酒的生香,而且也逐渐用于食醋、果汁、香料的生产加工中,应用前景很大。利用基因工程技术、原生质体融合技术、传统诱变育种技术等综合选育出产酯能力高、各种酯组合优化的生香酵母,这是酿酒行业急需研究和非常有意义的课题。

参考文献:

- [1] 王国良,宋俊梅,曲静然.生香酵母及其应用[J].食品工业,2004(3):16-17.
- [2] 周世水,熊建春.酒曲中生香酵母的分离鉴定与产酯工艺优化[J].现代食品科技,2010(1):98-99.
- [3] 陈兰兰.优良酵母菌株的筛选及其在干红葡萄酒中的应用[D].石河子:石河子大学,2009.
- [4] 徐军,罗惠波,崔德宝,等.大曲中酵母菌的分离及其鉴定[J].酿酒,2008(3):95-96.
- [5] 沈萍,范秀容,李广武.微生物学实验[M].3 版.北京:高等教育出版社,1999:43-44.
- [6] 胡开辉.微生物学实验[M].北京:中国林业出版社,2004.
- [7] 杨文博.微生物学实验[M].北京:化学工业出版社,2004.
- [8] 王小红,徐康,赵山,等.孝感凤窝酒曲中酵母菌的分离及特性研究[J].现代食品科技,2008,24(2):134-137.
- [9] 赵斌,何绍江.微生物学实验[M].北京:科学出版社,2002.
- [10] 巴尼特,佩恩·亚罗,胡瑞卿译.酵母菌的特征与鉴定手册[M].青岛:青岛海洋大学出版社,1991.
- [11] 黄晓东,程巢宣.白酒中总酸、总酯、总醛含量的常规连续测定[J].食品科技,2004(5):70-72.
- [12] 业出版社,1994:43-52.
- [13] 潘进权,沈月荣,李理,等.固态发酵制备毛霉蛋白酶的研究[J].中国调味品,2006(3):10-13.
- [14] 王丽英.雅致放射性毛霉液体深层培养及工业应用研究[D].保定:河北大学,2002.
- [15] 任文雅,廖永红.酱曲源毛霉的分离及其产蛋白酶条件的优化[J].北京工商大学学报,2009(4):1-5.
- [16] 李大和,刘念,李国红.浓香型大曲酒酿造中酯化菌研究的现状与展望[J].酿酒科技,2008(2):92-98.
- [17] 薛晓珍,张敏.新疆红花的主要营养成分及利用价值[J].中国食品与营养,2005(12):40-42.
- [18] 栾金水.黄酒中风味物质的研究[J].中国酿造,2002(6):21-23.
- [19] 吴惠勤,张桂英,何守明,等.酱香型酒香气成分研究(二):珍酒、茅台酒空杯香成分的 GC/MS 分析[J].分析测试学报,1996(5):5-8.
- [20] 程志青,吴惠勤,张桂英,等.酱香型酒香气成分研究(一):珍酒、茅台酒空杯香分离及官能色谱探索[J].分析测试学报,1996(4):1-4.
- [21] 于洪远,刘纯山.3-甲基-2-丁烯-1-醇的合成方法[J].精细化工中间体,2006(6):14-15.

(上接第 36 页)