

酿酒酵母菌株发酵过程中硫化氢产率动态变化研究

王春晓,刘延琳

(西北农林科技大学葡萄酒学院,陕西省葡萄与葡萄酒工程研究技术中心,西安 杨凌 712100)

摘要: 利用 3,5-二硝基水杨酸(DNS)法和硫化氢检测管检测法分析了高/低产硫化氢酿酒酵母菌株的发酵特性及其硫化氢产生特性。结果显示:高/低产硫化氢酿酒酵母菌株在发酵过程中的硫化氢产率变化趋势同为“双峰”趋势,且发酵前期峰值出现时间相同;高/低产硫化氢酿酒酵母在发酵速率和硫化氢产生比率上存在一定差异,且不同菌株的发酵速率与硫化氢产生比率之间没有必然联系。

关键词: 微生物; 酿酒酵母; 硫化氢; Triple M 模拟汁

中图分类号:TS261.1;TS262.6;TS261.4;Q93-3 文献标识码:A 文章编号:1001-9286(2012)10-0043-03

Study on the Dynamic Change of H₂S Formation Rate of *S. cerevisiae* during the Fermentation

WANG Chunxiao and LIU Yanlin

(College of Enology, Northwest A&F University, Shanxi Engineering Research Center for Wine and Viticulture, Yangling, Shanxi 712100, China)

Abstract: The characteristics of the fermentation and H₂S formation of *S. cerevisiae* strains with high/low H₂S yield rate were analyzed by DNS method and H₂S detector tube. The results indicated that the change trend of H₂S yield rate presented “double peaks” in both *S. cerevisiae* strains and peak value appearance time in prior fermentation period was almost the same, however, there was some difference in fermentation rate and H₂S formation rate for the two kinds of *S. cerevisiae* strains and there was no necessary correlations between the fermentation rate and H₂S formation rate.

Key words: microbe; *S. cerevisiae*; H₂S; Triple M simulation juice

酵母菌在发酵过程中产生的风味物质是形成葡萄酒风味的重要途径之一^[1]。长期以来,酵母菌在葡萄酒酿造过程中形成硫化氢是酿酒过程中最常见问题之一^[4,7-10,16]。风味特征为臭鸡蛋气味的硫化氢具有挥发性强、风味阈值低的特点,如其在酿造过程中过多积累则会给葡萄酒带来非常明显的风味缺陷^[12]。目前,已有各种工艺处理(如铜沉淀法、惰性气体法)和分子遗传方法试用于降低或避免发酵过程中 H₂S 的产生,然而,这些处理若使用不当则易给葡萄酒带来新的问题,如葡萄酒风味损失等。本研究通过检测高产和低产硫化氢菌株在模拟汁发酵过程中的硫化氢产率,分析总结酿酒酵母合成硫化氢的时期及动态变化趋势,以期能为实施相应措施提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

基金项目:国家葡萄产业技术体系建设专项经费(CARS-30-jg-3)。

收稿日期:2012-06-06

作者简介:王春晓(1987-),女,山东荣成人,硕士研究生,研究方向为葡萄酒微生物。

通讯作者:刘延琳(1966-),女,陕西富县人,教授,博士,研究方向为葡萄酒微生物、葡萄酒加工和葡萄酒质量控制,Email: yanlinliu@nwsuaf.edu.cn。

优先数字出版时间:2012-08-02;地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/52.1051.TS.20120802.1548.006.html>。

酵母菌株:本实验室分离筛选的高产硫化氢菌株 E6 和低产硫化氢菌株 P5。

DNS 试剂:3.25 g 3,5-二硝基水杨酸,2 mol/L 氢氧化钠 162.5 mL,22.5 g 丙三醇,用蒸馏水定容至 500 mL,棕色瓶 4℃ 恒温放置^[2];斐林试剂、葡萄糖标准溶液和次甲基蓝指示液的配制和使用参考 GB/T 15038—2006^[3];Triple M 模拟汁的配制参考^[13]。

发酵装置:主体部分由 1 L 玻璃罐和两孔硅胶塞组成,硫化氢检测管通过球形玻璃弯管与发酵罐内部相连,长不锈钢注射器针头通过硅胶塞孔插入发酵液面以下,用于还原糖含量检测。

1.2 实验方法

1.2.1 发酵条件

以 Triple M 模拟汁作为发酵液,发酵量为 600 mL,发酵温度为 200℃,摇床转速为 150 r/min。酵母菌的接

种量为 5×10^5 cfu/mL (利用血球计数板计数对数期培养的菌株以控制接种量), 每株酵母菌进行 3 个平行发酵。在发酵起点、16 h 和之后每 24 h 时取样, 取样时记录硫化氢产生量, 并使用 DNS 法测量发酵液的还原糖含量。当还原糖含量低于 2 mg/mL 时发酵结束, 停止取样。

1.2.2 DNS 法

葡萄糖标准曲线: 分别取 0.05 mL、0.10 mL、0.15 mL、0.20 mL、0.25 mL、0.30 mL、0.35 mL、0.40 mL、0.45 mL、0.50 mL、0.55 mL、0.60 mL、0.65 mL、0.70 mL、0.75 mL、0.80 mL、0.85 mL、0.90 mL、0.95 mL 和 1.00 mL 的 4 mg/mL 葡萄糖标准溶液于 25 mL 具塞试管中, 用蒸馏水补足至 1 mL, 加入 1.5 mL DNS 后混匀, 沸水浴中保持 5 min, 流水冷却至室温, 加 4 mL 蒸馏水, 混匀, 静置 20 min 后于 540 nm 处测量。

样品测定: 取 1 mL 原样或稀释后样品, 加入 1.5 mL DNS, 混匀, 沸水浴中保持 5 min, 流水冷却至室温, 加 4 mL 蒸馏水, 混匀, 静置 20 min 后于 540 nm 处测量^[2]。

1.2.3 硫化氢检测法

用硫化氢检测管测定硫化氢生成比率^[11,15]。

2 结果与分析

2.1 低产硫化氢酿酒酵母菌株合成硫化氢特点分析

低产硫化氢酿酒酵母菌株 P5 在发酵过程中产硫化氢的总比率为 0.313, 硫化氢产生比率随发酵进行的动态变化趋势见图 1。

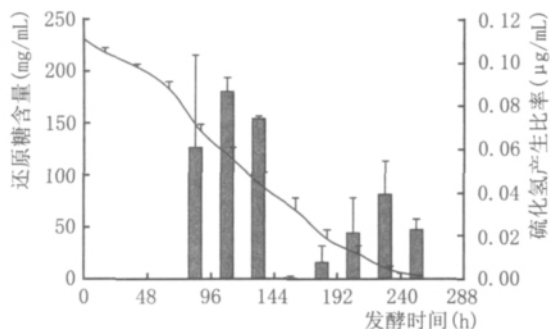


图 1 低产硫化氢酿酒酵母菌株 P5 发酵曲线和硫化氢产生比率动态曲线

图 1 表明, P5 的发酵速率比较快, 发酵周期为 232 h, 3 个平行发酵的发酵进程相对一致。P5 在发酵 64 h 开始产生硫化氢, 发酵 88 h 时硫化氢产率达到最高值, 随后逐渐下降至零点; 发酵后期, 160 h 时硫化氢产率逐渐增加, 208 h 时达到峰值随后下降。因此, 在整个发酵过程中, P5 的硫化氢产生比率变化曲线呈“双峰”, 且发酵后期的峰值低于发酵前期, 平行发酵之间的检测结果存在较小差异。

2.2 高产硫化氢酿酒酵母菌株合成硫化氢特点分析

高产硫化氢酿酒酵母菌株 E6 在发酵过程中产硫化氢的总比率为 1.018, 硫化氢产生比率随发酵进行的动态变化趋势见图 2。

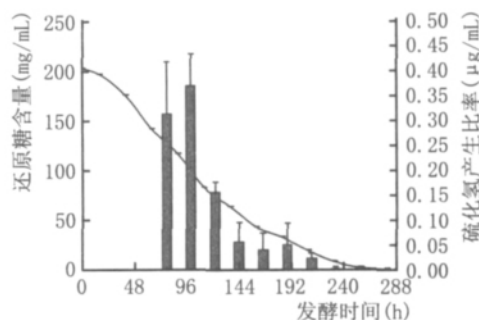


图 2 高产硫化氢酿酒酵母菌株 E6 发酵曲线和硫化氢产生比率动态曲线

E6 发酵速率相对较慢, 发酵周期为 288 h, 平行发酵的进程相对一致。发酵 64 h 开始产生硫化氢, 至 88 h 时硫化氢产生比率达到最大, 随后比率逐渐下降; 到发酵 164 h 时硫化氢产量再次增加随后下降。因此, 在整个发酵过程中 E6 的硫化氢产量变化曲线呈“双峰”, 但发酵前期峰值为整个发酵过程中硫化氢产生比率的最高值, 发酵后期峰值较低且与峰值前后点产率的差距较小。

3 结论

高产和低产硫化氢酿酒酵母在发酵速率和产硫化氢比率两方面都存在差异, 但是也存在一些相同的规律: 发酵过程中硫化氢产生比率变化趋势呈现“双峰”, 且发酵后期峰值低于发酵前期; 发酵前期产生硫化氢的起始时间相同, 都为发酵 64 h 之后, 且发酵前期峰值的产生都在 88 h。

影响不同酿酒酵母菌株在发酵过程中的硫化氢产率的因素有很多, 菌株的遗传背景是其中的主要因素, 另外发酵液中的营养物质水平如氮源和维生素、发酵速率、发酵过程中二氧化硫的添加和含硫农药的施用等等^[6]都会影响硫化氢产率。本研究采用 Triple M 模拟汁作为发酵液可以排除葡萄原料带来的不同发酵样品之间的差异, 同时 Triple M 模拟汁可以保证酵母菌对氮源和维生素的基本需求, 因此, 不存在营养物质缺乏引发合成硫化氢的现象。发酵过程中没有使用二氧化硫, 也可以排除无机硫源添加对硫化氢生成特性研究的影响。通过比较高产、低产硫化氢菌株的发酵曲线和硫化氢产率曲线, 发现不同菌株之间的发酵速率与硫化氢生成并没有必然联系, 这一结论与 Butzke & Park^[5]的研究结果相一致。

参考文献:

- [1] 陈娟, 杜木英, 阚建全. 葡萄酒的风味及其改良途径[J]. 酿酒科技, 2005(1): 68-71.

- [2] 赵凯,徐鹏举,谷广烨.3,5-二硝基水杨酸比色法测定还原糖含量的研究[J].食品科学,2008(29):534-536.
- [3] GB/T 15038—2006,葡萄酒、果酒通用分析方法[S].
- [4] Acree T E, Sonoff E P, Splittstoesser D. F. Effect of yeast strain and type of sulfur compound on hydrogen sulfide production[J]. Am. J. Enol. Vitic. 1972(23): 6-9.
- [5] Butzke C E, Park S K. Impact of fermentation rate changes on potential hydrogen sulfide concentrations in wine[J]. J. Microbiol. Biotechnol., 2011(21):519-524.
- [6] Fugelsang K C, Edwards C G. Wine Microbiology. Practical applications and procedures[M]. Second edition. New York: Springer. 2007: 18-128.
- [7] Jiranek V P, Henschke P A. Validation of bismuth-containing indicator media for predicting H₂S-producing potential of *Saccharomyces cerevisiae* wine strains under enological conditions [J]. Am. J. Enol. Vitic, 1995 (46):269-281.
- [8] Kumar G R, Ramakrishnan V, Bisson L F. Survey of hydrogen sulfide production in wine strains of *Saccharomyces cerevisiae* [J]. Am. J. Enol. Vitic., 2010(61):365-371.
- [9] Mendes-Ferreira A, Barbosa C, Falco V, Leão C, and Mendes-Faia A. The production of hydrogen sulphide and other aroma compounds by wine strains of *Saccharomyces cerevisiae* in synthetic media with different nitrogen concentrations[J]. J. Ind. Microbiol. Biotechnol., 2009(36):571-583.
- [10] Nowak A, Kusewicz D, Kalinowska H, Turkiewicz M, Patelski P. Production of H₂S and properties of sulfite reductase from selected strains of wine-producing yeasts[J]. Eur. Food Res. Technol., 2004 (219):84-89.
- [11] Park, Seun-Kook. Development of a method to measure hydrogen sulfide in wine fermentation[J]. J. Microbiol. Biotechnol., 2008 (18):1550-1554.
- [12] Rauhut D. Yeast production of sulfur compounds. In: Fleet G. H. (ed.), Wine microbiology and biotechnology[M]. Switzerland: Harwood Academic Publishers, Chur: 1993,183-223.
- [13] Spiropoulos A, Tanaka J, Flerianos I, Bisson L F. Characterization of hydrogen sulfide formation in commercial and natural wine isolates of *Saccharomyces*[J]. Am. J. Enol. Vitic., 2000 (51):233-248.
- [14] Ugliano M, Henschke P. A. Comparison of three methods for accurate quantification of hydrogen sulfide during fermentation [J]. Analytica Chimica Acta, 2010(660):87-91.
- [15] Varela C, Cárdenas J, Melo F, Agosin E. Quantitative analysis of wine yeast gene expression profiles under winemaking conditions[J]. Yeast, 2005(22):369-383.
- [16] Walker M D, Simpson W. J. Production of volatile sulphur compounds by ale and lager brewing strains of *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Lett. Appl. Microbiol., 1993(16): 40-44.

(上接第 42 页)

- 医药科技出版社,2010.
- [2] Bansiddhi J,Techadamrongsin Y,Anulaknapakorn K, et al.*Houttuynia cordata* Thunb[M].Bangkok,Thailand:The War Veteran Organization Press,2003:201-205.
- [3] Ch MI,Wen YF,Cheng Y.Gas chromatographic/mass spectrometric analysis of the essential oil of *Houttuynia cordata* Thunb. by using on-column methylation with tetramethylammonium acetate[J].Journal of AOAC International,2007,90:60-67.
- [4] Meng J, Dong XP, Zhou YS, et al. Studies on chemical constituents of phenols in fresh *Houttuynia cordata*[J].China Journal of Chinese Materia Medica,2007,32:929-931.
- [5] Toda, S. Antioxidative effects of polyphenols in leaves of *Houttuynia cordata* on protein fragmentation by copper-hydrogen peroxide in vitro[J].Journal of Medicinal Food,2005,8:266-268.
- [6] Li GZ, Chai OM, Lee MS, et al. Inhibitory effects of *Houttuynia cordata* water extracts an anaphylactice reaction and mast cell activation[J]. Biological and Pharmaceutical Bulletin, 2005,28: 1864-1868.
- [7] Lu HM, Liang YZ, Yi LZ, et al. Anti-inflammatory effect of *Houttuynia cordata* injection[J]. Journal of Ethnopharmacology, 2006,104:245-249.
- [8] Lau, KM, Lee, KM, Koon, CM, et al. Immunomodulatory and anti-SARS activities of *Houttuynia cordata*[J].Journal of Ethnopharmacology, 2008,118:79-85.
- [9] Nuengchamnong N, Krittasilp K, Ingkaninan K. Rapid screening and identification of antioxidants in aqueous extracts of *Houttuynia cordata* using LC-ESI-MS coupled with DPPH assay[J]. Food Chemistry 2009,117:750-756.
- [10] 罗堵子,张弘,郑华,等.玛咖浸泡酒工艺研究[J].食品科学, 2012,33(2):164-168.
- [11] 刘天质,曾玩嫻.白兰地总多酚含量测定方法初探[J].酿酒科技,2010(7):96-97.
- [12] Wu L.Effect of chlorogenic acid on antioxidant activity of Flos Lonicerae extracts[J].浙江大学学报(B 卷英文版),2007,8(9): 673-679.
- [13] 童珊珊,徐亚萍,金花,等.绵茵陈提取液中绿原酸的测定及其抗氧化活性研究[J].江苏中医药,2009,41(4):57-59.