

产硫化氢低的葡萄酒酵母的选育

尹吉泰¹, 张 军¹, 吴 军¹, 高年发²

(1.中法合营王朝葡萄酒有限公司,天津 300402; 2.天津科技大学生物工程学院,天津 300222)

摘要: 使用 EMS 对出发菌株 C 进行诱变,通过蛋氨酸抗性平板,筛选出了一株产硫化氢低、产谷胱甘肽高的突变株 M6, M6 的基本发酵性能与出发菌株 C 相差不大,但 GSH 的生成量比 C 提高了 47.7%, H₂S 的生成量比出发菌株 C 降低了 36.3%。

关键词: 微生物; 葡萄酒酵母; 诱变选育; 硫化氢 (H₂S); 谷胱甘肽 (GSH)

中图分类号: TS261.1; TS262.6 文献标识码: B 文章编号: 1001-9286(2006)06-0052-02

Breeding of Wine Yeast which Produced Low H₂S

YIN Ji-tai¹, ZHANG Jun¹, WU Jun¹ and GAO Nian-fa²

(1.Sino-French Joint-venture Dynasty Winery Co. Ltd, Tianjin 300402; 2. Institute of Bio-engineering, Tianjin University of Science and Technology, Tianjin 300222, China)

Abstract: A fine mutant M6 which produced low H₂S and high glutathione GSH was obtained through anti-methionine medium after the mutation of parent strain C I by the use of EMS. There was no evident difference in basic fermentation performance between M6 and parent strain C I. However, the yield of GSH by M6 increased by 47.7% than that by C I, and the yield of H₂S decreased by 36.3%.

Key words: microbe; wine yeast; mutation; methionine; H₂S; glutathione

葡萄酒发酵过程中会产生痕量的挥发性含硫化合物,它们挥发性很强,具有不愉快气味,通常描述为臭蛋味、臭鼬气味、大蒜味或洋葱味。虽然它们的生成水平只有每升数十至数百微克,但其感官刺激作用明显,对葡萄酒风味有破坏作用。已有人采用毛细管色谱柱和硫化物专用检测器对葡萄酒酵母发酵中产生的硫醇、乙硫醇和甲硫醇进行了分析。其他含硫化合物(氧硫化碳、二硫化碳、二甲基二硫醚)的生成情况最近也有文献报道。

含硫化合物中挥发性最强的是硫化氢(H₂S),它具有臭鸡蛋的气味。酵母在发酵中产生硫化氢的原因是多方面的:如葡萄皮所含硫;发酵醪中游离α-氨基氮(FAN)的水平不足;葡萄汁中泛酸缺乏,或吡哆胺缺乏、或半胱氨酸水平高于正常值等;还有文献报道添加亚硫酸对产生硫化氢也有作用。有人认为,硫化氢的产生与酵母菌株的性质有关。筛选的酵母菌株可减少产生硫化氢^[1]。

本文使用诱变的方法,对葡萄酒酵母进行改良,筛选出一株产硫化氢低的酵母,减少葡萄酒酵母发酵产生挥发性硫化物的含量,增加葡萄酒的抗氧化能力,改善葡萄酒的风味。

1 材料与方法

1.1 主要培养基

蛋氨酸抗性平板: YEPD 固体培养基加 2% 蛋氨酸。

1.2 主要测定方法

葡萄酒中 H₂S 含量的测定参照文献[2]; 葡萄酒中谷胱甘肽含量的测定参照文献[3]。

2 结果与分析

2.1 出发菌株的选择

通过对 4 株生产用葡萄酒酵母 C₁, C₂, W₁ 和 W₂ 性能的综合试验,结果表明,此 4 株酵母均属于优良的葡萄酒酵母;使用此 4 株酵母进行葡萄酒发酵试验,结果发现,在相同的发酵条件下,此 4 株酵母中 C₁ 发酵结束 H₂S 生成量最低,而 GSH 生成量最高。因此选择酵母菌 C₁ 作为产硫化氢低的葡萄酒酵母的诱变出发菌株。C₁ 的发酵性能见表 1。

表 1 C₁ 菌株发酵性能

耐酒精 (%, v/v)	耐 SO ₂ (mg/L)	耐单宁 (g/L)	耐糖性 (g/L)	凝聚性	发酵度
16	100	10	300	强	发酵完全

收稿日期 2006-02-21

作者简介: 尹吉泰(1963-),男,大学本科,酿酒工程师。

2.2 产 H₂S 低的葡萄酒酵母的 EMS 诱变与育种

2.2.1 EMS 诱变及突变株的初筛

2.2.1.1 EMS 诱变

以产硫化氢低的葡萄酒酵母菌株 C 作为出发菌株, 用 EMS 对其诱变处理、中间培养后, 取 4 mL 菌液离心, 收集菌体, 用 4 mL 无菌水离心洗涤 2 次, 重新悬浮于 4 mL 无菌水中。

2.2.1.2 蛋氨酸抗性平板筛选

取 1 mL 悬浮液适当稀释, 取 0.1 mL 涂布于 2% 的蛋氨酸抗性平板上, 28℃ 培养 2 d, 选取相对较大的菌株接于斜面上保存, 待测。

未经诱变的菌株在 1% 和 1.5% 的蛋氨酸抗性平板上能生长, 但菌落很小; 在 2% 的蛋氨酸抗性平板上不能生长, 诱变后的菌株在 2% 的蛋氨酸抗性平板上能长出小的菌落, 见图 1。选出相对较大的菌落, 接于斜面上, 培养后待测, 共选出 19 株, 编号为 M1~M19。



图 1 蛋氨酸抗性平板

甲硫氨酸即蛋氨酸是谷胱甘肽的结构类似物, 而谷胱甘肽对其合成途径中的第一个酶 -L- 谷氨酰-L- 半胱氨酸合成酶具有较强的反馈抑制作用, 筛选甲硫氨酸抗性突变株可以部分或完全解除这种抑制作用, 从而可以提高谷胱甘肽的积累。蛋氨酸抗性突变株在高产谷胱甘肽的同时, 会高产蛋氨酸, 提高蛋氨酸的积累^[4-6]。

将谷胱甘肽添加到试验葡萄汁中的发酵表明, 谷胱甘肽能在某些条件下抑制硫化物的生成^[1]; 在高产谷胱甘肽酵母发酵过程中, 谷胱甘肽大量积累降低了硫化氢的生成。硫酸盐的吸收和还原是由甲硫氨酸的水平调节的, 而不是由细胞中还原硫的水平调节的; 甲硫氨酸阻遏硫酸盐通透酶和涉及硫酸盐还原酶的合成; 因此, 甲硫氨酸的大量积累会降低硫化氢的生成。

综上所述, 酵母高产谷胱甘肽和大量积累甲硫氨酸的同时, 都会降低硫化氢的生成; 因此, 通过蛋氨酸抗性平板筛选所得的高产谷胱甘肽酵母菌, 可以通过提高谷胱甘肽的产量, 减少硫化氢的生成。

2.2.2 突变株的复筛

对初筛所得的 19 株突变株和出发菌株 C 同时进

行葡萄酒发酵试验, 发酵结束后对酒中的 H₂S 和 GSH 含量进行测定, 选择产 H₂S 少, GSH 含量高的突变株。

2.2.2.1 GSH 生成量的比较

对突变株葡萄酒发酵结束后的 GSH 含量进行测定, 结果见表 2。

表 2 出发菌株 C I 与 19 株突变株发酵结束后葡萄酒中 GSH 含量 (mg/L)

菌号	GSH 含量	GSH 增长量	菌号	GSH 含量	GSH 增长量
C I	95.0	0	M10	112.7	17.7
M1	103.2	8.2	M11	137.3	42.3
M2	101.4	6.4	M12	103.2	8.2
M3	86.4	-8.6	M13	92.3	-2.7
M4	97.7	2.7	M14	73.2	-21.8
M5	128.2	33.2	M15	113.6	18.6
M6	141.8	46.8	M16	102.3	7.3
M7	83.4	-11.6	M17	106.4	11.4
M8	110.0	15.0	M18	104.1	9.1
M9	130.0	35.0	M19	111.8	16.8

从表 2 可看出, 经过诱变处理后, 所得的 19 株突变株的 GSH 产量基本上均有所提高; 其中有 4 株菌 M5, M6, M9 和 M11 的产量提高较为明显, 出发菌株 C 提高了 30 mg/L 以上, 即 31.6% 以上。因此, 选择这 4 株菌进行以下的试验。

2.2.2.2 突变株 H₂S 的生成量的比较

对出发菌株 C 和突变株 M5, M6, M9, M11 发酵结束的葡萄酒进行 H₂S 的测定, 试验结果见图 2。

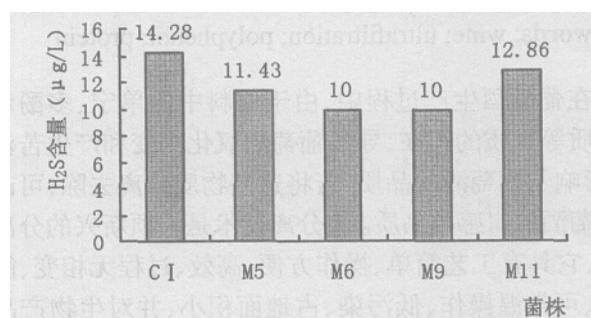


图 2 出发菌株 C 与突变株 H₂S 的生成量

由图 2 可看出, 与出发菌株 C 相比, M5, M6, M9 和 M11 4 株突变株的 H₂S 生成量均有所降低; 其中 M6 和 M9 的 H₂S 生成量为 10.00 μg/L, 比出发菌株 C 的 14.28 μg/L 降低了 30.0%。说明 C 经过诱变, 在高产 GSH 的同时, 降低了 H₂S 生成量。

2.2.2.3 突变株发酵性能与遗传稳定性试验

将选出的 4 株比出发菌株 C 产 GSH 高、产 H₂S 低的突变株 M5, M6, M9 和 M11, 进行发酵性能的测定, 并与出发菌株 C 进行对比, 突变株的发酵性能无太大变化。将获得的突变株 M6 连续传代 20 代, 取第 1

(下转第 56 页)

的小分子物质,如还原糖及有机酸均无差别,其透过性较好,而色度(OD₄₃₀)及总酚的差别较大,葡萄原汁经超滤后颜色变淡,涩味降低。

2.5 葡萄酒的超滤

葡萄酒在发酵及贮藏过程中,由于其中的单宁及多酚类物质的氧化聚合作用,会引起葡萄酒的褐变和苦涩味的出现。而利用超滤技术就能除去引起葡萄酒褐变的多酚物质及造成浑浊的大分子蛋白质等,使酒质更加稳定,色泽、口感、风味更加丰满圆润。葡萄酒在超滤前后其成分会发生变化,结果见表4。

表4 10000 Da 超滤膜处理前后葡萄酒成分的比较

项目	处理量(L)	乙醇(%)	还原糖(%)	总酸(g/L)	总氮(mg/L)	总酚(mg/L)	OD ₄₃₀
原酒	20.0	12.0	2.0	7.1	315	301	0.034
滤过液	18.6	12.0	2.0	6.6	295	288	0.014
保持液	1.3	12.0	2.0	6.5	348	345	0.049

从表4可知,采用10000 Da的超滤膜处理葡萄酒,滤过液与原酒中的小分子物质,如乙醇、还原糖、总酸等没有太大差别;而大分子物质,如总酚、总氮等在滤过液中要明显少于原酒中的含量;并且滤过液的色泽比原酒

要淡,其口感要明显优于原酒,没有苦涩味。

3 结论

葡萄汁在0.2 MPa, 5~40℃温度下,经30000 Da超滤膜处理后,可除去其中的大分子物质,从而改善葡萄汁的色度和品质,而由于还原糖及有机酸是小分子物质,其透过性较好,超滤不会改变它们的含量。

葡萄酒在0.2 MPa, 35~40℃温度下,经过10000 Da超滤膜处理,进一步去除了可引起葡萄酒褐变的多酚及造成浑浊的大分子蛋白质,消除了苦涩味,使葡萄酒的透明度增加,酒质更加稳定,风味更加丰满圆润。

参考文献:

- [1] 王能,郭宏,刘宗林.膜分离技术在食品工业中的应用[J].食品科学,2000,21(12):178-180.
- [2] 天津轻工业学院,等.工业发酵分析[M].北京:中国轻工业出版社,1997.
- [3] 朱宝镛.葡萄酒工业手册[M].北京:中国轻工业出版社,1995.
- [4] 王华.葡萄与葡萄酒实验技术操作规范[M].西安:西安地图出版社,1999.
- [5] 王湛.膜分离技术基础[M].北京:化学工业出版社,2001.

(上接第53页)

代、5代、10代、15代、20代酵母进行葡萄酒发酵试验,发酵结束测定其GSH和H₂S的生成量,并与诱变前的出发菌株C进行对照,结果见图3。

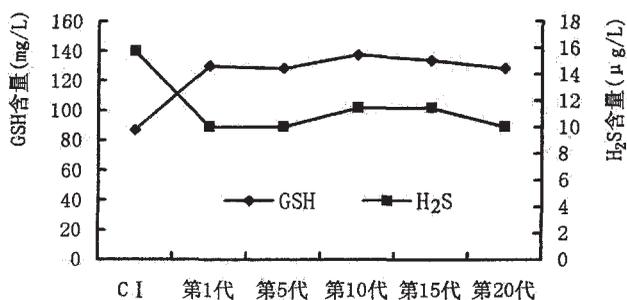


图3 突变株M6遗传稳定性试验

由图3可知,M6在传代20代的过程中,GSH和H₂S的生成量基本稳定,分别比出发菌株C提高了47.7%和降低了36.3%(以第20代计),说明突变株M6的遗传稳定性良好。

3 总结

对出发菌株C进行EMS诱变,获得了一株优良的突变株M6。M6的基本发酵性能与C相差不大,但H₂S生成量降低了36.3%,GSH的生成量提高47.7%,达到了预计的高产GSH和低产H₂S目的。突变株M6可以应用于葡萄酒生产,改善葡萄酒的风味。

参考文献:

- [1] 赵光鳌,尹卓容,张继民,等译.葡萄酒酿造学-原理及应用(第1版)[M].北京:轻工业出版社,2001.
- [2] 李春华,等.用亚甲基兰比色法测定微量硫的标准曲线[J].化肥工业,1992,(3):47-49.
- [3] 郭黎平,刘国良,张卓勇,等.铜(Ⅱ)-新铜试剂-谷胱甘肽-乙醇体系显色反应研究[J].光谱学与光谱分析,2000,(3):412-414.
- [4] 李崎,顾国贤,柏竹安,章克昌.抗老化啤酒酵母的选育[J].无锡轻工大学学报,1998,(4):46-49.
- [5] 童群义,陈坚,李华钟.高产谷胱甘肽的酵母菌选育及其培养条件的研究[J].工业微生物,2002,(2):13-17.
- [6] 施碧红,黄建忠,等.啤酒酵母M-05变株合成谷胱甘肽的研究[J].福建师范大学学报,1996,(4):91-95.

《酿酒科技》中国科技核心期刊