

酿酒酵母菌的耐高糖驯化研究

李伟安¹, 唐圣云^{1,2}, 王 戎¹, 刘清斌², 李海峰¹

(1.四川理工学院 生物工程系, 四川 自贡 643000; 2.五粮液集团有限公司, 四川 宜宾 644000)

摘要: 通过逐步提高培养基中糖的浓度, 对实验室保存的 3 株酿酒酵母菌 A₁、A₂ 和 A₃ 进行耐高糖驯化, 并做了发酵力的对比试验。结果表明, 菌株 A₁ 和 A₃ 通过驯化能耐 35 °Bx 的糖度, 并且具有良好的遗传稳定性。

关键词: 酵母菌; 耐高糖; 驯化

中图分类号: TS261.1; Q93-3; TS262.6

文献标识码: B

文章编号: 1001-9286(2011)12-0054-02

Research on High-sugar-tolerance Domestication of Wine Yeast

LI Weian¹, TANG Shengyun^{1,2}, WANG Rong², LIU Qingbin² and LI Haifeng²

(1. Bioengineering Department, Sichuan University of Science and Engineering, Zigong, Sichuan 643000;

2. Wuliangye Group Co. Ltd., Yibin, Sichuan 644000, China)

Abstract: High-sugar-tolerance domestication of three yeast strains kept in Lab including A₁, A₂ and A₃ was carried out through increasing gradually sugar content in culture mediums according to physiological and biochemical characteristics of yeast. In addition, contrast experiments of their fermenting power were done. The results showed that after the domestication, strain A₁ and strain A₃ could grow well in culture mediums of 35 °Bx sugar content and they had good genetic stability.

Key words: yeast; high-sugar-tolerance; domestication

酵母菌是发酵工业中一类重要的微生物。目前, 已知的酵母菌有 500 多种, 共有 56 个属, 分属于子囊菌亚门、担子菌亚门及半知菌亚门^[1]。其中, 酿酒酵母是一种重要的典型菌种。酿酒酵母不仅应用于啤酒、白酒、果酒的酿造及面包的制作, 而且因其富含维生素和蛋白质, 也可作为食用、药用和饲料酵母。此外, 还可从中提取核酸、麦角固醇、谷胱甘肽、细胞色素 C、辅酶 A 及三磷酸腺苷等。在酒精发酵过程中, 发酵醪液的渗透压比较高(如高糖), 会引起细胞水分活度和细胞质组成发生显著变化, 酵母菌的细胞膜及菌体内外的酶受到破坏, 从而抑制酵母菌的生长和发酵。浓醪发酵是酒精工业生产的新趋势, 这种发酵工艺生成的酒精浓度较高, 同时醪液中的糖度也高, 因此醪液中的渗透压也较高^[2]。因此, 若能选育出具有耐渗透压(如耐高糖)特性的酿酒酵母菌株, 将会很好地为酒精工业服务。

本文以从大曲中筛选出的 1 株酿酒酵母为出发菌株, 通过逐步提高培养基糖浓度的方法, 对试验菌株进行驯化选育, 并对其发酵性能进行了测定。

1 材料与方法

1.1 仪器

收稿日期: 2011-09-27

作者简介: 李伟安(1986-), 男, 山东潍坊人, 在读硕士研究生, 研究方向为微生物代谢调控及白酒发酵。

优先数字出版时间 2011-11-11; <http://www.cnki.net/kcms/detail/52.1051.TS.20111111.0956.001.html?uid=>

显微镜, 蒸汽灭菌锅, 恒温振荡器, 糖度计, 特种净化工作台, 电热恒温培养箱。

1.2 材料

出发菌株(记为 A): 实验室保存酵母 A₁、A₂ 和 A₃。

麦芽汁培养基: 将麦芽粉与水按 1:4 的比例在 60 °C 恒温水浴锅内糖化 4 h, 过滤、稀释到 5~6 °Bx, 121 °C 灭菌 20 min (液体培养基加入 2% 琼脂即为固体培养基), pH 值约为 6.0。

蜂蜜液体培养基^[3]: 蜂蜜(分别稀释成 15 °Bx、20 °Bx、25 °Bx、28 °Bx、30 °Bx、33 °Bx、35 °Bx、37 °Bx、39 °Bx、40 °Bx), 尿素 0.10%, KH₂PO₄ 0.05%, MgSO₄ 0.02%, 生长素适量。

发酵培养基: 灭过菌的澄清葡萄汁。

1.3 原理与方法

1.3.1 原理

酵母菌本身存在一套可以对渗透压进行调节的系统, 由于酵母渗透压调节系统的表达方式和强弱程度不同, 对外界环境表现出的耐渗性也有明显差异。因此, 可以通过逐步提高培养基中糖浓度的方法, 来对出发酵母菌株的耐渗性(耐高糖)进行驯化和研究。

1.3.2 方法

1.3.2.1 酵母菌的活化

用接种环取1环酵母,接种到10 mL麦芽汁培养基中,28 °C恒温培养。每天转接1次,共转接3次。

1.3.2.2 酵母菌的耐高糖驯化

将活化后的菌种接入装有10 mL糖度为15 °Bx蜂蜜液体培养基的试管中,28 °C恒温培养3 d,重复3次。15 °Bx驯化结束后,从试管中分别吸取0.1 mL菌悬液转接入装有10 mL糖度为20 °Bx蜂蜜液体培养基的试管中,28 °C恒温培养3 d,以此类推,直到糖度为40 °Bx。驯化结束后,挑选残糖量较少的优良菌株进行保藏。

1.3.2.3 形态观察

将驯化出来的优良酵母菌株涂布于麦芽汁琼脂培养基,观察其菌落形态,并在光学显微镜下观察比较出发菌株与驯化菌株的细胞特征。

1.3.2.4 稳定性和传代试验

将选育出的耐高糖酵母经过连续5代的遗传转接,传代培养,然后再接入到35 °Bx的培养基中测定其发酵力,与第一代的耐高糖酵母进行比较试验。

1.3.2.5 发酵性能测定

将驯化阶段筛选出来的优良菌株,以25%的接种量转接入25 °Bx的灭过菌的澄清葡萄汁中,30 °C条件下静置发酵,以酿酒酵母进行对照,每隔24 h测CO₂产生量(失重量),6 d后,检测还原糖以及酒精含量^[4]。

2 结果与分析

2.1 不同糖度下各菌株的残糖量及糖耗

表1 不同糖度下各菌株的残糖量及糖耗 (°Bx)

培养基糖度	A ₁		A ₂		A ₃	
	残糖	糖耗	残糖	糖耗	残糖	糖耗
15	5.83	9.17	5.85	9.15	5.86	9.14
20	10.87	9.13	10.81	9.19	10.87	9.13
25	15.80	9.20	15.78	9.22	15.81	9.19
28	18.84	9.16	18.89	9.11	18.83	9.17
30	20.90	9.10	20.88	9.12	20.87	9.13
33	23.89	9.11	31.97	1.03	23.88	9.12
35	25.94	9.06	34.02	0.98	25.90	9.10
37	35.99	1.01	36.01	0.99	35.97	1.03
39	38.01	0.99	37.98	1.02	38.03	0.97
40	38.98	1.02	39.00	1.00	39.02	0.98

从表1可以看出,在培养基糖度为15~30 °Bx时,A₁、A₂和A₃的糖耗基本相同,相差不大;在培养基糖度为33~37 °Bx时,A₁和A₃的糖耗基本没有变化,但此时A₂的糖耗已经明显下降,基本无糖耗;在培养基糖度为39~40 °Bx时,A₁、A₂和A₃的残糖量均较高,基本没有糖耗。因此,选择A₁和A₃作为耐高糖酵母菌株(记为B)。

2.2 形态观察

在光学显微镜下,A酵母菌落为乳白色,边缘整齐规则,有明显隆起,菌落面积小;B酵母菌落为乳白色,边缘不整齐,有微小波浪形曲折,无明显突起,菌落面积大。B酵母和A酵母的细胞形状无明显变化,多为球形或卵圆形,但B酵母细胞的体积和半径明显减小。

2.3 稳定性和传代试验

通过对比A和A⁵的发酵力来判断酵母的遗传稳定性。

表2 A和A⁵酵母发酵力比较结果

糖度	传代酵母			
	A ₁	A ₁ ⁵	A ₃	A ₃ ⁵
35 °Bx	77.4	76.7	63.3	64.1

注:A表示第1代酵母菌,A⁵表示第5代酵母菌。

从表2可以看出,第5代菌与第1代菌相比,发酵力无明显变化,具有可遗传的变异性。

2.4 发酵性能测定

耐高糖驯化后得到的优良菌株B₁和B₃经葡萄酒发酵实验的结果见表3。

表3 葡萄酒发酵实验结果

项目	CO ₂ 产生量(g)	酒精度(%vol)	残糖浓度(°Bx)
对照	9.236	6.6	16.34
B ₁	14.143	12.1	13.56
B ₃	12.705	10.8	11.28

从表3可以看出,从CO₂产生量、酒精度和残留还原糖浓度三方面综合比较,驯化后的菌株B₁和B₃的发酵性能都超过了对照菌株。与菌株B₁相比,菌株B₃的发酵性能相对差一点,但仍要远强于对照菌株。

3 结果与讨论

本实验经过驯化和逐级筛选,选育出耐高糖酵母菌,并成功应用于实验室葡萄酒发酵。若通过紫外线诱变、原生质体融合等生物技术手段对酵母菌进行改造,还可以进一步提高其耐高糖的能力。此外,若能将耐高糖和耐高温的特性在同一酵母菌株上表达出来,将会大大提高酿酒工业的生产效率,产生巨大的经济效益,这方面的内容还有待进一步的研究。

参考文献:

- [1] 蔡信之,黄君红.微生物学[M].第2版.北京:高等教育出版社,2002.
- [2] 赵硕,李平.耐高渗(高糖)酵母菌株的选育[D].安徽农业大学,2010.
- [3] 吴大平,颜复志.耐高渗蜂蜜酒酵母的选育[J].福建农学院学报,1993(3):349-352.
- [4] 郝林.食品微生物学实验技术[M].第1版.北京:中国农业出版社,2001.