

# 浓香型白酒生产酵母菌筛选和特性研究

黄海<sup>1,2</sup>,李光辉<sup>1</sup>,杨官荣<sup>2</sup>,黄志渝<sup>2</sup>,文成兵<sup>3</sup>

(1.四川理工学院,四川 自贡 643000;2.四川省酿酒研究所,四川 广汉 618000;

3.绵阳市丰谷酒业有限责任公司,四川 绵阳 621000)

**摘要:** 从四川省酿酒研究所生产基地采集的黄浆水、酒曲、窖泥等含菌材料中分离筛选得酒用酵母菌。经筛选得到产酒精能力强的2株酵母菌,对2株酒用酵母在麦芽汁小瓶发酵时的CO<sub>2</sub>失重量和其对酸的耐受性等进行了综合比较。结果表明,菌株1的综合性能最好。

**关键词:** 微生物; 酵母菌; 酒用酵母; 菌种筛选; 发酵性能

**中图分类号:** TS261.1; TS262.31; Q93-3

**文献标识码:** A

**文章编号:** 1001-9286(2011)03-0027-03

## Screening of Yeast Strains for the Production of Luzhou-flavor Liquor & Their Properties

HUANG Hai<sup>1,2</sup>, LI Guang-hui<sup>2</sup>, YANG Guan-rong<sup>1</sup>, HUANG Zhi-yu<sup>2</sup> and WEN Cheng-bing<sup>3</sup>

(1. Biotechnology Engineering Dept., Sichuan University of Science and Engineering, Zigong, Sichuan 643000; 2. Sichuan Wine-brewing Research Institute, Guanghan, Sichuan 618000; 3. Feng'gu Liquor Industry Co.Ltd., Mianyang, Sichuan 621000, China)

**Abstract:** Yeast strains for wine use were isolated from yellow water, liquor starter, and pit mud in the production base of Sichuan wine-brewing Research Institute. And two yeast strains with strong ethanol-producing capacity were screened out. Then acid tolerance and CO<sub>2</sub> weight loss of the two strains in wort bottle fermentation were compared. The results showed that No.1 strain had better performance.

**Key words:** microbe; yeast strains; yeast for wine use; yeast screening; fermenting performance

酒用酵母是与人类关系最广泛的一种酵母,不仅可用作酿酒,在现代分子和细胞生物学中用作真核模式生物,其作用相当于原核的模式生物大肠杆菌。酒用酵母是发酵工程中最常用的生物种类。酿酒酵母的细胞为球形或者卵形,直径5~10 μm。其繁殖的方法为出芽生殖。一般自然分布于高糖、偏酸环境,适宜生长温度25~32℃。

在传统白酒发酵过程中,当通气充分时,酵母菌进行好氧呼吸,代谢能力强、速度快、菌体生长繁殖旺盛;在厌氧发酵阶段的厌氧条件下,进行厌氧呼吸,经厌氧乙醇发酵代谢途径,发酵产生乙醇及相关发酵产物<sup>[1]</sup>。分析酒用酵母的特性对白酒生产以及充分发挥其代谢发酵生产能力,提高白酒发酵原料利用率及白酒发酵生产率,具有重要的现实意义。

本文采用微生物学的相关技术原理和方法,分别从采集于四川省酿酒研究所生产基地的黄浆水、酒曲、窖泥等含菌材料中,经分离得酒用酵母。选取产酒精能力强的两株酵母,对其发酵性能进行了比较,测定了2株酒用酵母在麦芽汁小瓶发酵时的CO<sub>2</sub>失重量,对其酸耐受性进

行了综合比较。结果显示菌株1的综合性能最佳。现将相关内容介绍如下。

### 1 材料与方法

#### 1.1 菌种来源

采集于四川省酿酒研究所生产基地的黄浆水、酒曲、窖泥等含菌材料,经分离得到酒用酵母。

#### 1.2 主要材料

YX系列手提式高压蒸汽灭菌锅: 江门澳江医疗设备有限公司; 868型pH计: 热电(上海)仪器有限公司; 波美计: 浙江余姚仪表二厂; 721分光光度计: 浙江余姚仪表二厂; SKY-2102C摇床: 上海苏坤实业有限公司。

#### 1.3 试剂

乳酸: 成都科龙化工试剂厂; 葡萄糖: 成都科龙化工试剂厂; 红四氮唑(TTC): 上海华东师范大学化工厂; 琼脂粉(细条状): 福建省石狮市琼脂副食品加工厂。

#### 1.4 培养基

PDA培养基: 去皮马铃薯200g, 葡萄糖20g, 琼脂

**基金项目:** 四川理工学院大学生创新基金课题(项目编号NJ2009-10)。

**收稿日期:** 2010-11-22

**作者简介:** 黄海(1986-),男,四川三台人,工学学士,研究方向:工业微生物发酵。



15~20 g,蒸馏水 1000 mL,自然 pH,121 °C 灭菌 20 min。

麦芽汁培养基:干大麦芽粉加 4 倍水,在 58~65 °C 下保温 3~4 h,碘液试验至糖化完全为止,用纱布过滤调糖度为 10 °Bx<sup>[2]</sup>。固体培养基加入 2 %琼脂即可。滤液若浑浊不清,可用鸡蛋白澄清。方法是将一个鸡蛋白加水约 20 mL,调匀至生泡沫为止,然后倒在糖化液中搅拌煮沸再过滤<sup>[3]</sup>。

指示剂培养基:10 °Bx 琼脂麦芽汁培养基灭菌,在 60 °C 左右以无菌操作加入适量的 TTC(0.5 % TTC 1 mL 加到 100 mL 琼脂中,使用前先灭菌)溶解,倒平板。

## 1.5 实验方法

### 1.5.1 酒用酵母的分离与筛选

把采集于绵阳市丰谷酒厂的黄浆水、酒曲和窖泥用无菌水稀释适当倍数,采用涂布法分别涂布于指示剂培养基上,置于恒温箱中,30 °C 培养 48 h。利用产酒精能力强的酵母菌能还原红四氮唑(TTC)变为红色这一特性,筛选出红色最深的菌落 2 株<sup>[4]</sup>,编号为菌株 1 和菌株 2,并保存于斜面试管。

### 1.5.2 酒用酵母耐酸性的测定

麦芽汁培养基灭菌后,在无菌条件下分别制备不同 pH(2.5、3.0、3.5、4.0、4.5 和 5.0)的麦芽汁,对应分装 50 mL 于带棉塞的 250 mL 小三角瓶中。接种后将三角瓶置于 30 °C、200 r/min 的 SKY-2102C 的摇床上,培养 30 h 后于 660 nm 测定其 OD 值,用未接种的麦芽汁作空白对照。

### 1.5.3 酒用酵母最适生长温度的测定

分别挑取原种斜面菌株接入麦芽汁培养基平皿中,分别于 22 °C、24 °C、26 °C、28 °C、30 °C、32 °C、34 °C、36 °C、38 °C 和 40 °C 条件下恒温培养 48 h,观察菌株生长情况。结果以-、+、±、++、+++、++++、+++++ 表示。

### 1.5.4 酒用酵母生长曲线的测定

将酵母菌接种于装有 50 mL 麦芽汁并带棉塞的 500 mL 小三角瓶,在 30 °C 温度下,200 r/min 的摇床培养,每隔 2 h 取样 1 次,用未接种的麦芽汁作空白对照,于 660 nm 测其 OD 值,以培养时间为横坐标,OD 值为纵坐标,绘制生长曲线。

### 1.5.5 酒用酵母发酵力的测定<sup>[5]</sup>

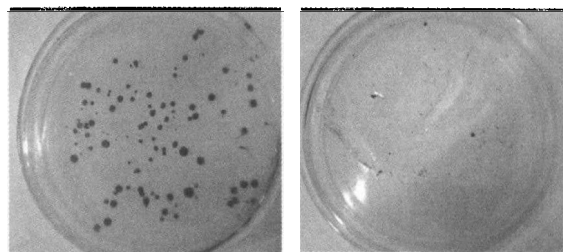
采用 CO<sub>2</sub> 失重法测定菌株的酵性能,将酵母菌接种接种于装有 100 mL 麦芽汁的带棉塞的 500 mL 三角瓶,于 30 °C 温度下、200 r/min 条件下摇床培养,以 CO<sub>2</sub> 的减少的量计算酵母菌的发酵力。

## 2 结果与分析

### 2.1 TTC 显色图

1 号菌株和 2 号菌株的 TTC 显色结果见图 1。从图

1 中可以看出,1 号菌菌落大小较均一,颜色较深,且深浅一致,说明酵母的繁殖能力和产酒精能力较一致,在发酵过程中同步性较好。从 2 号菌株的 TTC 显色图与 1 号菌株的 TTC 显色图相比可看出,2 号菌菌落普遍较小、大小也不均一,颜色较深,且深浅一致,说明 2 号酵母菌株生长代谢的同步性不一致。



1 号菌株的 TTC 显色图 2 号菌株的 TTC 显色图

图 1 菌株的 TTC 显色图

### 2.2 菌株最适生长温度的确定

对 2 株酵母菌的生长温度进行测定,确定其最适生长温度,结果见表 1。

表 1 最适生长温度的测定

| 编号   | 温度(°C) |    |    |     |       |       |    |    |    |    |
|------|--------|----|----|-----|-------|-------|----|----|----|----|
|      | 22     | 24 | 26 | 28  | 30    | 32    | 34 | 36 | 38 | 40 |
| 菌株 1 | +      | +  | +  | ++  | +++++ | +++   | +  | +  | -  | -  |
| 菌株 2 | +      | +  | +  | +++ | +++++ | +++++ | +  | +  | -  | -  |

由于微生物的生命活动都是由一系列生物化学反应组成的,而这些反应受温度的影响又极其明显,故温度成了影响生物生长繁殖的最重要因素之一。与其他生物一样,任何微生物的生长温度范围尽管有宽有窄,但总有最低生长温度、最适生长温度、最高生长温度。从表 1 中可知,2 株酵母菌的生长温度范围为 28~32 °C。当温度高于 36 °C,2 株酵母菌基本不生长。此 2 株酵母菌在 28~32 °C 之间生长时的分裂代时最短或生长速率最高。

### 2.3 酒用酵母耐酸性比较

对 2 株菌生长的耐酸性进行研究比较,结果见表 2、图 2。

表 2 酸浓度对菌株生长的影响

| 初始 pH | 菌株 1 pH 变化 | 菌株 1 的 OD 值 | 菌株 2 pH 变化 | 菌株 2 的 OD 值 |
|-------|------------|-------------|------------|-------------|
| 2.5   | 2.7        | 0.006       | 2.8        | 0.008       |
| 3.0   | 3.3        | 0.044       | 3.2        | 0.064       |
| 3.5   | 3.2        | 0.028       | 3.8        | 0.010       |
| 4.0   | 4.2        | 0.024       | 4.1        | 0.027       |
| 4.5   | 4.2        | 0.051       | 4.5        | 0.059       |
| 5.0   | 6.1        | 0.800       | 3.4        | 0.866       |

培养基的氢离子浓度(pH 值)对酵母的生命活动有显著的影响,氢离子能改变细胞原生质膜胶体的电荷。培

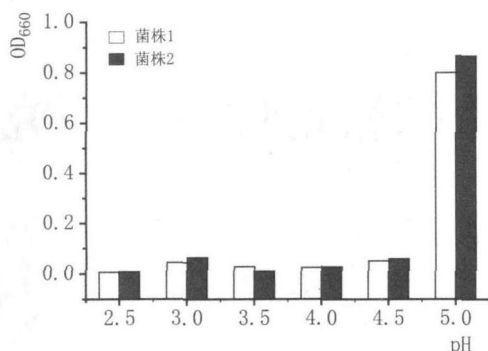


图2 酸浓度对菌株生长的影响

培养基的氢离子浓度(pH 值)除了对细胞发生直接影响之外,还对细胞产生间接的影响,可影响培养基中营养物质的离子化程度,从而影响微生物对营养物质的吸收,影响环境中有害物质对微生物的毒性,以及影响代谢反应中各种酶的活性等。由图2可知,当培养液的pH为2.5~4.0时,2株菌的生长随pH的变化而变化不大,当pH>4时,2株菌的数量随pH的增大而逐渐增加,当pH>5时,酵母菌的数量明显增加。

#### 2.4 酒用酵母生长曲线的测定与比较分析

在不同的培养时间内测定菌株的生长情况,测定菌株的OD值,结果见图3。

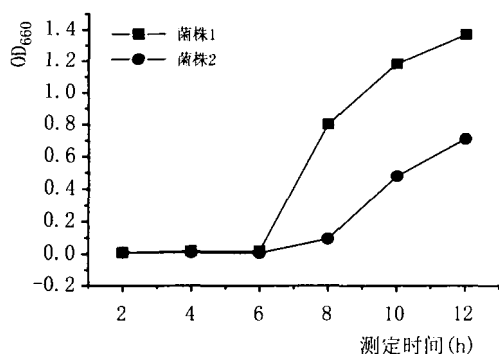


图3 菌株1与菌株2的生长曲线

图3为两株菌的生长曲线,从图3中可以看到,菌株1的细胞繁殖速度较快,有明显的对数生长期,且生长旺盛,近入衰亡期较晚;而菌株2的细胞增殖较缓慢,没有菌株1的代谢繁殖能力旺盛,且较早进入对数期。可见经过筛选得到的酵母菌株1繁殖力强,生长快,这使得酵母接入发酵醪后,酵母能迅速增殖,很快达到主发酵期,迅速发酵,缩短发酵时间,减少被杂菌污染的机会。

#### 2.5 发酵性能比较分析

在30℃时进行发酵,考察菌株1与菌株2的发酵性能,结果见图4。

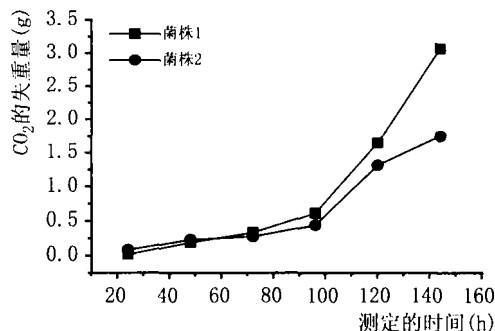


图4 菌株1和菌株2的发酵性能比较

从图4中可以看出,菌株1与菌株2比较,同样的发酵时间菌株1的失重速度更快,说明其产生的CO<sub>2</sub>量更多,发酵起步早、速度快,能较早地达到主发酵期,形成生长优势,有效地抑制杂菌,使发酵过程中的生理生化反应正常进行,能对白酒的质量有初步的保证。

#### 3 结论

对采集的黄浆水、酒曲、窖泥含菌材料,经分离得酒用酵母,对其特性进行研究。通过发酵、耐酸性能对比,发现菌株1在发酵速率上和产酒精能力上占优势,而两菌株对耐酸性没有太大的差别。综合比较,菌株1的综合性能最佳。通过对酒用酵母的分离及其特性研究,对白酒的生产以及充分发挥其代谢发酵生产能力,提高白酒发酵原料利用率及白酒发酵生产率有一定的指导意义。

#### 参考文献:

- [1] 周德庆.微生物学教程(第二版)[M].北京:高等教育出版社,2007.160-164.
- [2] 郝林.食品微生物学实验技术(第一版)[M].北京:中国农业出版社,2001.88-95.
- [3] 田晖.微生物应用技术[M].北京:中国农业出版社,2008.34-38.
- [4] 陈卫平,涂谨,熊建华,等.红四氮唑在酒精酵母选育中的应用效果研究[J].酿酒科技,2003,(6):35-37.
- [5] 黄秀梨,辛明秀.微生物学实验指导(第二版)[M].北京:高等教育出版社,2008.10-11.

## 中国成年饮酒者年均消费纯酒精达 10.61 升

本刊讯:据《中国食品工业网》报道,近日,世界卫生组织的一份最新《酒精与健康全球状况报告》中指出,中国成年饮酒者(特指15岁以上)每年平均消费饮酒量折合成纯酒精则为10.61升。其中男性饮酒量更大,一年能喝下26瓶一斤装的52度二锅头。而这些男性还有不少存在过量饮酒问题。在全球统计中,所有男性死亡中有6.2%与酒精有关,而女性的这一比例明显下降许多,有1.1%。(小小蓉)

来源:中国食品工业网