

酱香型白酒糟醅中耐高温酵母菌的特性研究

徐超英¹, 赖世强², 徐厚禄³, 曹文涛¹, 徐李娟⁴

(1. 贵州大学发酵工程与生物制药省重点实验室, 贵州 贵阳 550003; 2. 贵州赖永初酒业有限公司, 贵州 贵阳 550018;
3. 贵州茅台酒股份有限公司, 贵州 仁怀 564501; 4. 贵州省质量技术监督局, 贵州 贵阳 550003)

摘要: 从酱香型白酒堆积发酵糟醅中筛选得到1株在45℃生长良好的耐高温酵母菌, 对其耐乙醇、耐酸、耐糖能力及发酵力进行了研究。结果表明, 该菌耐乙醇能力为6%vol, 最适pH值为5.0, 耐糖能力为25%, 发酵力为6.628 g/50 mL, 生长耐受最高温度为45℃。

关键词: 酱香型白酒; 糟醅; 耐高温酵母; 生理特性

中图分类号: TS262.33; TS261.1; TS261.4; Q93-3 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-9286(2012)08-0038-03

Research on the Properties of High-temperature Resistant Yeast Strains in Distiller's Grains of Maotai-flavor Liquor

XU Caoying¹, LAI Shiqiang², XU Houlu³, CAO Wentao¹ and XU Lijuan⁴

(1. Fermentation Engineering and Bio-pharmacy Key Lab of Guizhou University, Guiyang, Guizhou 550003; 2. Laiyongchu Liquor Industry Co.Ltd., Guiyang, Guizhou 550018; 3. Maotai Co.Ltd., Renhuai, Guizhou 564501; 4. Guizhou Provincial Quality and Technology Supervision Bureau, Guiyang, Guizhou 550003, China)

Abstract: A high-temperature resistant yeast strain (grew well at 45℃) was screened out from stacking fermented grains of Maotai-flavor liquor and its resistance to ethanol, acid and sugar and its fermenting power were investigated. The results showed that its ethanol resistance capacity was 6%vol, its sugar resistance capacity was 25%, its fermenting power was 6.628 g/50 mL, the optimum pH for its growth was 5.0, and its highest tolerance temperature was at 45℃.

Key words: Maotai-flavor liquor; distiller's grains; high-temperature resistant yeast; physiological properties

堆积发酵是酱香型白酒独有的工艺特点, 此过程可网罗空气中的微生物并使其大量繁殖。生产过程通过堆积积累大量的香味物质及其前体物质。高温会抑制酵母菌的生长繁殖, 对酒精发酵产生抑制作用。为此, 本实验对从堆积发酵糟醅中分离筛选出的酵母菌的耐高温性能进行研究, 从而提高生产效率和出酒率提供应用参考^[1]。

1 材料与方法

1.1 材料

酱香型白酒堆积糟醅: 贵州省赖永初酒业有限公司恒兴酒厂二车间提供。

YPD 液体培养基: 葡萄糖 20 g, 蛋白胨 20 g, 酵母膏 10 g, 蒸馏水 1000 mL, 自然 pH 值, 113℃灭菌 30 min 后加青霉素 40 U/mL。

YPD 固体培养基: 在 YPD 液体培养基中加入 2% 的琼脂。

基金项目: 贵州省科技厅工业公关项目, 黔科合 GZ 字 (2011) 3015。

收稿日期: 2012-05-04

作者简介: 徐超英 (1984-), 女, 硕士研究生, 研究方向为制药与发酵工艺。

通讯作者: 曹文涛, 教授, 硕士生导师。

优先数字出版时间: 2012-07-19; 地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/52.1051.TS.20120719.1647.002.html?uid=>。

发酵力培养基(麦芽汁培养基): 市售。

1.2 试验方法

1.2.1 酵母菌的分离与纯化

用自制的取样器从堆子的4个对角和中心的上、中、下层取样。取10 kg 糟醅混匀, 用四分法进行缩分, 获得糟醅 2.5 kg, 从中称取 25 g 糟醅, 加入 225 mL 无菌生理盐水中, 吸 1 mL 加入 9 mL 无菌生理盐水, 得到 10^{-2} 菌体溶液, 再从 10^{-2} 菌体溶液吸 1 mL 加入到 9 mL 无菌生理盐水即为 10^{-3} 菌体溶液, 以此类推分别得到 10^{-4} 、 10^{-5} 、 10^{-6} 、 10^{-7} 、 10^{-8} 菌体溶液。分别吸取稀释倍数为 10^{-5} 、 10^{-6} 、 10^{-7} 、 10^{-8} 菌体溶液 0.2 mL 做平板涂布培养, 每个浓度做 3 个平行实验, 培养 24~48 h。利用平板划线法最终得到纯种单菌落。

1.2.2 耐高温酵母菌的筛选^[2]

挑取 1 环在斜面上活化的酵母置于装有 10 mL 的

表1 各酵母菌的形态特征

编号	菌落颜色	菌落特征	菌落边缘	光泽	形状
Y ₁	白色	圆形,光滑	边缘整齐	无	椭圆
Y ₂	半透明中间有白色	圆形,光滑中间凸起	边缘整齐	有	卵圆形
Y ₃	白色	圆形,表面褶皱	边缘锯齿并向四边伸展	无	圆形
Y ₄	浅粉色	圆形,光滑	边缘整齐	有	椭圆
Y ₅	乳白	圆形,光滑	边缘整齐	有	圆形
Y ₆	乳白	圆形,光滑	边缘整齐	无	圆形或椭圆
Y ₇	白色	圆形,光滑	边缘褶皱	无	圆形

YPD 液体培养基中,放入 30℃ 的恒温培养箱中培养 24 h,摇匀,分别吸取 0.1 mL 酵母悬液置于装有 10 mL 的 YPD 液体培养基的试管中,分别置于 37℃、39℃、41℃、43℃、45℃、47℃ 的恒温水浴锅中处理 48 h,取出摇匀,然后吸取 1 mL 注入 YPD 固体培养基平板上,均匀涂布,放入 30℃ 培养箱中培养 48 h,观察菌株生长情况。

1.3 生长曲线的测定^[3]

将酵母菌接种于装有 5 mL 麦芽汁液体培养基的试管中,在 45℃ 温度下培养,每隔 2 h 取样 1 次,用未接种的麦芽汁液体培养基作空白对照,于 660 nm 测其 OD 值。

1.4 酵母菌的酿造环境耐性特性

1.4.1 耐酒精能力的测定^[4]

制备初始乙醇体积分数分别为 0、2 %vol、4 %vol、6 %vol、8 %vol、10 %vol、12 %vol、14 %vol、16 %vol、18 %vol 和 20 %vol 的 YPD 液体培养基,45℃ 下培养 24 h,于 660 nm 测其 OD 值。

1.4.2 耐酸性测定^[4]

制备初始 pH 值分别为 3、3.5、4.0、4.5、5.0、5.5 的 YPD 液体培养基,45℃ 下培养 24 h,于 660 nm 测其 OD 值。

1.4.3 耐糖性测定^[4]

配制初始葡萄糖质量分数分别为 5 %、10 %、15 %、20 %、25 %、30 %、35 %、40 %和 45 %的 YPD 液体培养基,45℃ 下培养 24 h,于 660 nm 测其 OD 值。

1.4.4 发酵力测定^[5]

在斜面培养基上接种供试菌种,以 30℃ 恒温培养 48 h 制成斜面种子,挑取 1 环在斜面上活化的酵母于装有 10 mL 的 YPD 液体培养基中,放入 30℃ 的恒温培养箱中培养 24 h,摇匀,然后以 10⁶ 个/mL 接入 0.1 mL 的酵母菌于装有 50 mL 糖化液并带棉塞的锥形瓶中,以 45℃ 恒温培养,每培养 24 h 称重 1 次,以生成 CO₂ 的量来衡量酵母菌株发酵力的强弱。

2 结果与分析

2.1 菌种形态鉴定

对分离的菌株进行形态培养观察,其形态特征见表 1。

2.2 各菌株耐高温的性能

按上述方法进行耐温实验,各酵母菌的耐温能力见表 2。

表 2 7 株酵母菌耐受温度的实验结果

菌株编号	温度(℃)					
	37	39	41	43	45	47
Y ₁	+++	++	++	+	-	-
Y ₂	++	++	+	-	-	-
Y ₃	+++	++	++	++	+	-
Y ₄	-	-	-	-	-	-
Y ₅	+	-	-	-	-	-
Y ₆	+	-	-	-	-	-
Y ₇	++	+++	++	+	-	-

注:+++ 生长非常好;++ 生长良好;+ 生长;- 不生长。

从表 2 可看出,Y₃ 能在 45℃ 生长,耐温性良好,同时对其在 46℃ 下进行耐受温度实验,结果表明,Y₃ 在 46℃ 下不生长。

2.3 生长曲线

对 Y₃ 的生长曲线进行测定,结果见图 1。

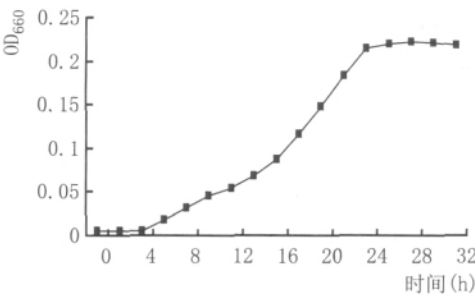


图 1 耐高温酵母的生长曲线

从图 1 可以看出,Y₃ 生长的延迟期比较短,在接入培养基后 4 h 即可生长,但对数生长期较长,从 4~25 h,说明传代能力或对环境营养的利用能力不是很强,进入平衡期过慢。

2.4 酵母菌对酿造环境的耐性分析

2.4.1 初始乙醇浓度对酵母菌生长的影响

酵母菌在无氧条件下产生酒精和二氧化碳,酒精浓度过高会产生毒害作用,抑制菌体生长,降低产量。初始乙醇浓度对酵母菌生长的影响见图 2。

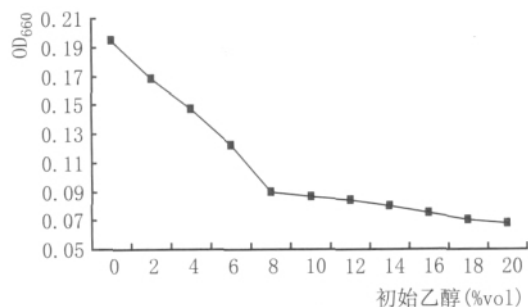


图2 初始乙醇浓度对酵母菌生长的影响

从图2可以看出,初始乙醇浓度越高,OD₆₆₀值越小,当乙醇浓度在6%vol以上时,对Y₃的生长有抑制作用。

2.4.2 初始酸度对酵母菌的影响

在酱香型白酒生产堆积发酵过程中,pH值过高或过低均会影响酵母菌的生理代谢活动,也对发酵原料的转化利用能力及乙醇的发酵生产能力有影响^[6]。初始酸度对酵母菌的影响见图3。

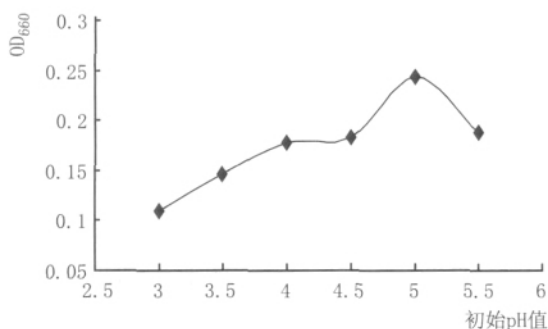


图3 初始pH值对酵母菌生长的影响

从图3可以看出,该菌在pH值为5.0时,OD₆₆₀值最大,达到0.243。表明该菌最适生长pH值为5.0。

2.4.3 初始糖浓度对酵母菌生长的影响

碳源浓度对发酵也产生影响,若培养基中营养物质过于丰富,会导致酵母异常增殖,对发酵产乙醇会产生不良影响;反之,供给量过小,则酵母生长过于缓慢,同时乙醇合成会减少甚至停止^[7]。初始糖浓度对酵母菌的生长影响见图4。

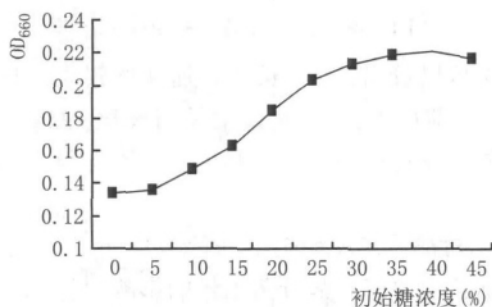


图4 初始糖浓度对酵母菌生长的影响

从图4可以看出,初始糖浓度越高,OD₆₆₀值越大。当

初始糖质量分数在25%以上时,该菌仍然能生长,但生长速度较慢;在初始糖浓度为40%以上时,OD₆₆₀值呈下降趋势,说明高糖浓度也会抑制酵母菌生长。

2.4.4 酵母菌发酵力

酵母能利用糟醅中的还原糖,发酵生成酒精和二氧化碳,所以用麦芽汁培养基,以测定发酵过程中二氧化碳的生成量来衡量该菌的发酵力,结果见表3。

表3 Y₃在45℃发酵力测定 (g/50 mL)

菌株	发酵时间(d)						
	1	2	3	4	5	6	7
Y ₃	1.301	2.952	4.545	5.792	6.628	7.041	7.255

对Y₃耐高温酵母菌进行发酵力的测定分析,从表3可以看出,在发酵5d时发酵力可达6.628 g/50 mL,以后随着时间的延长,Y₃发酵力增加不明显。

3 结论

3.1 从酱香型白酒堆积发酵糟醅中分离出7株酵母菌,并筛选出1株在45℃下仍能生长的酵母菌Y₃,其最适生长pH值为5.0,OD₆₆₀为0.243;耐酒精能力为6%vol,6%vol以上的乙醇浓度会抑制该菌的生长;耐糖能力为初始糖浓度25%,当此值达25%以上时,该菌仍然能生长但速度较慢;在45℃下,发酵力为6.628 g/50 mL。

3.2 对耐高温菌Y₃的发酵液进行蒸馏,蒸馏液用酒精计测量,酒精计指数为零(酒精计刻度范围是0~40%vol,精确度是0.1%vol)。该菌在液体培养基表面产膜,并有果香味。根据产酯高的菌株,一般产酒精能力都比较低及其会在液体培养基表面产膜的特性^[1],初步判断此耐高温菌为产酯菌,但具体的确定实验还有待于以后的进一步研究。

参考文献:

- [1] 沈怡方.白酒生产技术全书[M].北京:中国轻工业出版社,2007.
- [2] 任道群,唐玉明,等.酱香型酒糟醅酵母菌的初步分类及选育[J].酿酒,2007(6):44-46.
- [3] 黄秀梨,辛明秀.微生物学实验指导[M].2版.北京:高等教育出版社,2008:71-73.
- [4] 朱会霞,孙金旭,张伟,等.高产酵母菌Co-158生理特性研究[J].酿酒科技,2007(5):20-23.
- [5] 王福荣.酿酒分析与检测[M].北京:化学工业出版社,2005.
- [6] 罗慧波,李光辉.耐酒精酵母菌的筛选研究[J].四川理工学院学报,2004(4):151-154.
- [7] 程殿林.微生物工程技术原理[M].北京:化学工业出版社,2007:114-124.