

产酯酵母的筛选及其发酵特性研究

蒲 春¹, 胡沂淮^{1,2,3}, 贾亚伟¹, 严启梅¹

(1. 江苏洋河酒厂股份有限公司, 江苏 宿迁 223800; 2. 南京农业大学, 江苏 南京 210095; 3. 淮阴工学院, 江苏 淮安 223003)

摘要: 从大曲中筛选到 8 株产酯酵母, 选酶活最高菌株进行 26S rDNA 鉴定, 确定其为异常毕赤酵母。试验结果表明, 该酵母麸曲的酯化力可达到 19.36 mg/100 mL。该菌株麸曲最佳培养时间为 6 d; 液体培养最高耐受温度为 43 ℃; 最低耐受 pH 值为 3.5; 最高耐受酒精度为 18 %vol; 最适生长温度为 27 ℃; 利用葡萄糖产酒精能力较低。

关键词: 产酯酵母; 己酸乙酯; 筛选; 发酵特性

中图分类号: TS262.3; TS261.1; Q93-3; TQ920 文献标识码: A 文章编号: 1001-9286(2013)03-0047-03

Screening of Ester-producing Yeast Strains and Study on Its Fermenting Properties

PU Chun¹, HU Yihuai^{1,2,3}, JIA Yawei¹ and YAN Qimei¹

(1. Yanghe Distillery Co.Ltd, Suqian, Jiangsu 223800; 2. Nanjing Agricultural University, Nanjing, Jiangsu 210095;

3. Huaiyin Institute of Technology, Huai'an, Jiangsu 223003, China)

Abstract: Eight ester-producing yeast strains were isolated from Daqu. The strain with the highest esterifying capability was identified as *Pichia anomala* by 26S rDNA sequence analysis. Its esterifying capability was as high as 19.36 mg/100 mL after 6d culture. The strain was capable of resisting to 43 ℃ at highest, pH 3.5 at lowest, and alcoholicity 18 % at highest in the process of liquid medium culture. Its optimum growth temperature was at 27 ℃ and its alcohol-producing capability was weak by use of glucose.

Key words: ester-producing yeast; ethyl caproate; screening; fermenting properties

产酯酵母又称生香酵母, 主要属于产膜酵母和假丝酵母, 是白酒和黄酒发酵产香的重要菌种。生香酵母有增酯、提香作用, 适合各种白酒发酵。产酯酵母主产乙酸酯类, 特别是乙酸乙酯, 常见的产酯酵母有清香型酒中的汉逊酵母及酱香型酒中的球拟酵母^[1]。浓香型白酒生产中, 己酸菌的作用至关重要, 一定量的生香酵母可以促进己酸菌生长、繁殖, 提高己酸活菌数及代谢产物的产量^[2,3]。酵母自溶后, 又可为发酵微生物提供营养及香味的前体物^[4,5]。本试验从本厂大曲中筛选酯化能力高的酵母菌株, 以期应用于发酵生产。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 样品来源

安琪生香活性干酵母, 购自安琪酵母股份有限公司; 曲粉, 本厂自制。

1.1.2 化学试剂

己酸、乙酸、乳酸、丁酸乙醇等分析纯试剂, 购自国药

集团化学试剂有限公司。

1.1.3 培养基

富集筛选培养基: 酵母浸膏 1 g, 蛋白胨 2 g, 葡萄糖 2 g, 三丁酸甘油酯 1.5 mL, 溴甲酚紫 0.004 g, 蒸馏水 100 mL, 115 ℃ 灭菌 20 min。固体培养基加 2 % 琼脂。

YPD 培养基: 酵母浸膏 10 g, 蛋白胨 20 g, 葡萄糖 20 g, 蒸馏水 100 mL, 115 ℃ 灭菌 20 min。

发酵培养基: 酵母浸膏 1 g, 蛋白胨 2 g, 葡萄糖 10 g, (NH₄)₂SO₄ 0.1 g, KH₂PO₄ 0.1 g, MgSO₄·7H₂O 0.1 g, 蒸馏水 100 mL, 115 ℃ 灭菌 20 min。

麸皮培养基: 麸皮 100 g, 乳酸 0.4 mL, 葡萄糖 0.5 g, 水 70 mL, 115 ℃ 灭菌 20 min。

1.2 实验方法

1.2.1 菌种筛选

将 1 g 大曲粉加入装有 25 mL 富集培养基的 250 mL 三角瓶中, 以 30 ℃、100 r/min 富集培养 48 h^[6], 移取 5 mL 培养液至另一盛有富集培养基的三角瓶中进行 2

收稿日期: 2012-10-10

作者简介: 蒲春(1983-), 女, 山东淄博, 硕士, 微生物研究员。

通讯作者: 胡沂淮(1970-), 男, 江苏淮安, 博士, 副教授, 研究方向: 食品科学与工程。

优先数字出版时间 2012-12-14; 地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/52.1051.TS.20121214.1103.001.html>。

次富集。富集3次后,稀释涂布平板,取变色圈大、透明清晰的菌落划线分离,纯化直至得到纯菌株。将纯化后的菌株贮存于20%~30%的甘油中,于-80℃冰箱中保存。

1.2.2 筛选酯化力高的菌株

超低温保存菌种30℃活化,取1mL接种于100mL YPD培养基中以100 r/min培养24h,血球计数板测菌体个数为 8×10^8 个/mL,菌液以5%接种量接入固体发酵培养基,28℃静置培养4d。称取相当于5g干曲的曲量,加入100mL含1%己酸,20%乙醇的酯化体系中,32℃酯化100h,加水50mL蒸馏,接溜出液100mL,气相色谱测酯含量^[7,9],酯化力定义为每100mL溜出液中己酸乙酯的含量。筛选酯化力最高的菌株。

1.2.3 菌种鉴定

筛选的酯化力最高菌株,由生工生物工程(上海)有限公司进行26SrDNA鉴定。

1.2.4 菌株发酵特性

酯化力曲线:将扩培后的菌液接入麸皮培养基,每隔1d测1次酯化力,共测8d,绘制酯化力曲线。

四大酯催化生成能力:测菌株对己酸乙酯、乙酸乙酯、乳酸乙酯、丁酸乙酯的催化生成能力。测定方法同酯化力测定,用等量相应有机酸代替己酸。

耐温性试验:以杜氏小管内产气情况为指标,观察酵母菌对高温的耐受性。

耐酸耐酒精试验:以活菌数和杜氏小管内产气情况为指标,考察不同酸度及酒精度对酵母生长的影响。

最适生长温度试验:以活菌数为指标,考察温度对酵母生长的影响,确定最佳生长温度。

发酵试验:以CO₂失重和乙醇产量为指标,考察酵母利用糖产气产酒精能力,并与安琪生活活性干酵母进行对比。

2 结果与分析

2.1 产酯酵母的初筛

通过富集培养,涂布平板,划线分离纯化,筛选出8株产酯酵母。将酵母分别扩培后接种到麸皮培养基,培养4d后测麸曲的酯化力,结果见表1。由表1看出,1号菌株酯化力最强。将1号菌株暂命名为Yeast-1。

表1 初筛产酯菌酯化力 (mg/100 mL)

菌株编号	酯化力	菌株编号	酯化力
1	12.62	5	10.99
2	10.72	6	3.56
3	10.79	7	3.76
4	10.75	8	4.17

2.2 菌落及菌体形态

Yeast-1的菌落及菌体形态见图1。该菌菌落干燥,

无光泽,乳白色,有皱褶,边缘不整齐;菌体呈卵圆形,多边形芽殖^[9]。

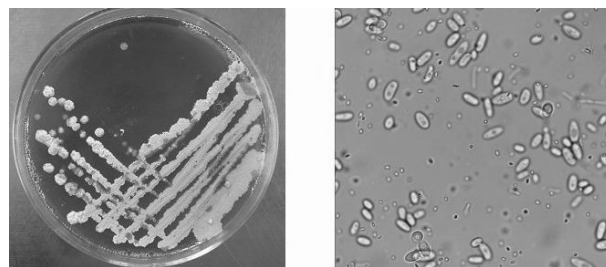


图1 Yeast-1的菌落与菌体形态

2.3 26SrDNA 同源性分析及系统发育树的建立

测序得到的26SrDNA基因序列,保留其可靠的589bp序列进行系统发育分析。通过NCBI的BLAST比对,获得同源性较高的已知分类单元,然后用phyip软件将这些序列构建系统发育树见图2。Yeast-1的可靠序列与异常毕赤酵母(*Pichia anomala*)的序列相似性为100%。异常毕赤酵母是毕赤酵母属中的一个种,异常毕赤酵母的一大特点是基于培养基的链式脂肪酸高产水果味乙酯。异常毕赤酵母是乙酸酯高产菌,也能产生有玫瑰香气的芳香族2-苯基乙醇,所以,国外研究异常毕赤酵母酿造葡萄酒的较多。

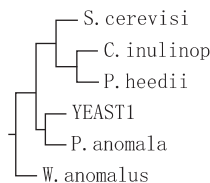


图2 Yeast-1的26SrDNA系统发育树

2.4 酵母Yeast-1的发酵特性

2.4.1 酯化力曲线

酯酶既能产酯,也分解酯,最终剩余酯多者即为优良菌株。绘制Yeast-1麸曲酯化力曲线见图3。由图看出,当酵母Yeast-1在麸皮培养基中培养6d时,麸曲的酯化力最高。

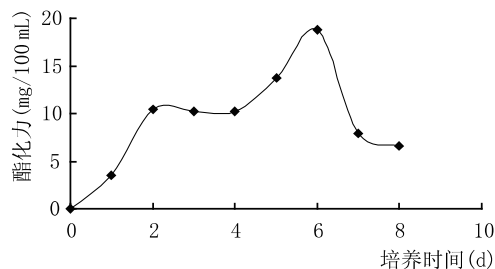


图3 Yeast-1根据时间的酯化力曲线

2.4.2 四大酯催化生成能力

麸曲对己酸乙酯、乙酸乙酯、乳酸乙酯、丁酸乙酯的催化生成能力见表2。由表2看出,Yeast-1对乙酸乙酯

的催化力最强,达到 27.31 mg/100 mL;对己酸乙酯的催化力次之,达到 19.36 mg/100 mL;对乳酸乙酯的催化力最弱。研究发现,产酯酵母有升己酸乙酯,降乳酸乙酯的作用^[10],实验结果与研究相符。

表2 Yeast-1 对 4 种有机酸的催化力 (mg/100 mL)

项目	有机酸			
	正己酸	乙酸	乳酸	丁酸
催化力	19.36	27.31	5.31	7.77

2.4.3 耐温性

有氧时,酵母菌利用葡萄糖产 CO₂ 和水;无氧时,酵母菌利用葡萄糖产 CO₂ 和酒精。所以,产气情况可作为酵母菌的一个生长指标。Yeast-1 对高温的耐受性见表 3。由表 3 看出,当温度达到 45℃ 时,Yeast-1 停止产气。所以,菌株生长最高耐受温度为 43℃。

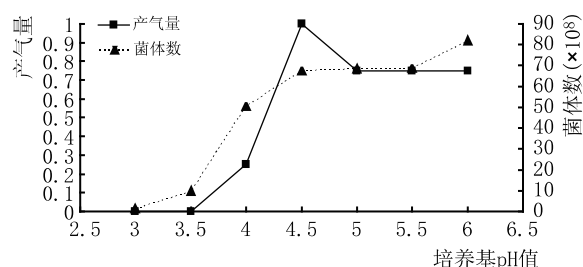
表3 Yeast-1 对高温的耐受性

项目	温度(℃)				
	39	41	43	45	47
产气量	++++	++++	+	-	-

注:“++++”表示杜氏小管内充满气;“+”表示杜氏小管内产生 1/4 的气体;“-”表示杜氏小管内没有气体。

2.4.4 耐酸耐酒精

Yeast-1 在不同 pH 值液体培养基内的生长情况见图 4。由图 4 可看出,当 pH 值为 4.5 时,Yeast-1 产气量最高;当 pH 值为 3.5 时,Yeast-1 菌体数达 1.11×10^8 个,但不产气。由此可见 Yeast-1 的最低耐受 pH 值为 3.5。



注:1表示杜氏小管内充满气体;0.5表示杜氏小管内产生 1/2 的气体;0表示杜氏小管内没有气体。

图4 pH值对Yeast-1生长的影响

Yeast-1 在不同酒精度下的生长情况见图 5。菌体在酒精度为 6 %vol~21 %vol 的培养条件下都不产气,可耐受 18 %vol 酒精度。

2.4.5 最适生长温度

酵母胞内酶与胞外酶都有酯化能力,但以胞内酶为主。所以同体积培养基中酵母菌活细胞越多,越健壮,酯化力就越高。Yeast-1 的温度生长曲线见图 6。由图 6 可看出,当温度为 27℃ 时,菌体数最多,所以 Yeast-1 的最佳生长温度在 27℃ 左右。

2.4.6 发酵特性

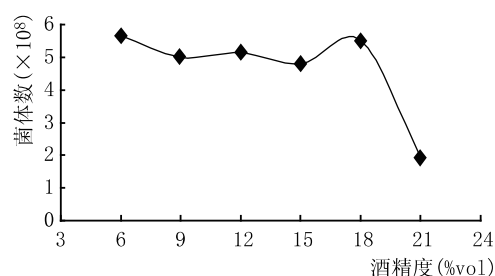


图5 酒精对Yeast-1生长的影响

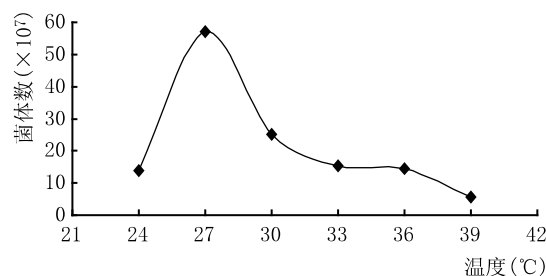


图6 Yeast-1 的温度生长曲线

Yeast-1 在不同温度下利用糖产气产酒精能力见图 7。由图 7 可看出,当温度达到 29℃ 时,Yeast-1 的产 CO₂、酒精量最高,分别为 1.91 g、1.3 mL/100 mL。对比同等发酵条件下安琪生香活性干酵母产 CO₂、酒精量分别为 3.51 g、2 mL/100 mL。该菌株利用葡萄糖产酒精能力较低。

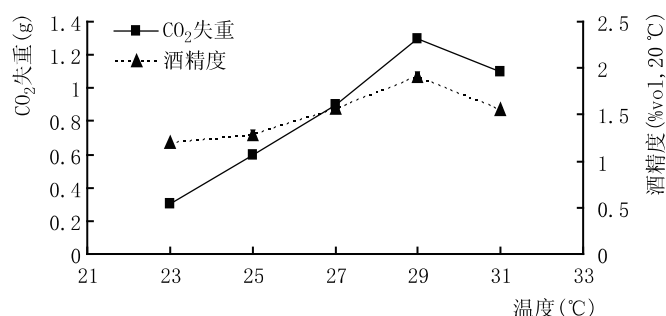


图7 Yeast-1 不同温度下发酵能力

3 结论

从本厂大曲粉中筛选到 8 株产酯酵母,选酶活最高菌株进行 26 S rDNA 鉴定,初步确定其为异常毕赤酵母。该菌株接种麸皮培养基,培养 6 d 时酯化活力最高。麸曲对乙酸乙酯和己酸乙酯的催化生成能力分别为 27.31 mg/100 mL, 19.36 mg/100 mL。该菌株生长的最高耐受温度为 43℃;最低耐受 pH 值为 3.5;最高耐受酒精度为 18 %vol;最适生长温度为 27℃。发酵试验结果表明,该菌株利用葡萄糖产酒精能力较低。由以上特点看出,该菌株适合与其他高产酯菌株混合制作生香酒醅,或

(下转第 53 页)

表7 出酒率和感官评价

编号	优质酒出酒率 (%)	感官评价	打分 (分)
1	16.97	窖香浓,醇甜,略带生杂味	83
2	18.66	窖香浓,醇甜,略带杂味	85
3	18.03	窖香浓,醇甜,有异味	80

$$\text{优质酒出酒率} = \frac{\text{每甬优质酒重量}}{\text{每甬投料重量}} \times 100\%$$

3 结论

运用模糊数学法与感官评价相结合的方法来判断不同糠用量对发酵的影响,得到的结果更加科学合理,也能更直观地反映结果。

通过模糊数学法对发酵结束后的糟醅进行了判定,发现在春季当糠用量为24%和26%时,出窖糟醅的发酵情况比较好。通过对酒样感官评价发现,糠用量为24%时的优质酒率和酒质也较好。这是因为春季温度

相对较低,不利于微生物生长。通过提高糠用量可以带入较多的氧气,促进微生物生长,提高产酒率和酒质,但糠用量过多容易产生糠味,影响酒质。综合评价得出春季应当使用24%的糠壳用量。

参考文献:

- [1] 方军.模糊数学在浓香型白酒母糟与黄水感官质量鉴定中的应用研究[J].酿酒科技,2010(3):31-33
- [2] 付勋.采用模糊数学方法对母糟感官质量评价定量化的研究[J].酿酒科技,2011(9):20-23.
- [3] 霍红.模糊数学在食品感官评价质量控制方法中的应用[J].食品科学,2004(6):185-187.
- [4] 曹冬梅.模糊数学在豆浆感官评定中的应用[J].沈阳农业大学学报,2004(2):39-41.
- [5] 方军.浓香型白酒打量水工艺研究[J].食品与发酵科技,2009(5):3-5.
- [6] 沈怡方.白酒生产技术全书[M].北京:中国轻工业出版社,1998.

(上接第49页)

与其他微生物共酵。

参考文献:

- [1] 范广璞.生香酵母的培养方法及在白酒生产中的应用[J].江苏食品与发酵,2008(1):23-25.
- [2] 李大和,李家顺,李天道.产酯酵母在浓香型曲酒生产中的应用[J].酿酒,1990(6):17-20.
- [3] 李志军,郭荆学,周静芳,等.生香活性干酵母在浓香型白酒生产中的应用研究[J].酿酒科技,1999(4):32-33.
- [4] 李大和,刘念,李国红.浓香型大曲酒酿造中酯化菌研究的现状与展望[J].酿酒科技,2008(2):92-98.
- [5] 周恒刚.酵母酯化[J].酿酒,1991(5):8-11.
- [6] 鄢洪德,汪钊,李光.产酯酶微生物菌种的筛选研究[J].工业微生物,2007(6):44-48.
- [7] 沈怡方.白酒生产技术全书[M].北京:中国轻工业出版社,2009.
- [8] 徐前景,陈茂彬,张岩,等.酯化红曲(酶)的酯化特性研究[J].酿酒,2009(1):52-54.
- [9] 陆振群.酒曲中生香酵母的分离及生理生化鉴定[J].酿酒科技,2012(3):37-39.
- [10] 王国良,宋俊梅,曲静然.生香酵母及其应用[J].食品工业,2004(3):16-17.

江西省天贻酒业招聘启事

因业务发展需要,诚邀营销总监(可承包)、大区经理、营销专员若干名加盟。

因生产需要,高薪诚邀酱香型白酒酿造师、白酒勾调师、动力工程师、烤酒工等专业人士加盟。

本公司是新转制企业,目标高机会大,待遇优厚,为优秀人才提供良好的发展空间!

地址:江西省瑞金市红都广场

电话:0797-7112299

手机:18679793888

网址:www.jxtyjy.com

邮箱:929031346@qq.com