

茅台酒高温工艺应激条件对活性酵母 细胞衍生物的影响

季克良 郭坤亮

(中国贵州茅台酒厂有限责任公司,贵州 仁怀 564501)

摘要: 探讨茅台酒高温应激对活性酵母衍生物(Live Yeast Cell Derivative :LYCD)的影响。结果表明,传统的茅台酒高温工艺能有效刺激酿酒酵母 MT281LYCD 产生的生物活性;应激发生在 50℃和 45 min 时,制备的 LYCD 活性最强。

关键词: 白酒; 活性酵母衍生物; 高温工艺; 茅台酒

中图分类号 :TS262.33 ;TS261.4 文献标识码 :A 文章编号 :1001-9286(2005)03-0046-03

The Effects of Live Yeast Cell Derivative by Moutai High Temperature Technology

Ji Ke-liang and GUO Kun-liang

(China Guizhou Moutai Liquor Distillery Co. Ltd., Renhuai, Guizhou 564501, China)

Abstract: The effects of live yeast cell derivative (LYCD) by Moutai high temperature technology were discussed in this paper. The experiment results suggested that LYCD was observed after treated by Moutai high temperature tradition technology from *Saccharomyces cerevisiae* MT281. the biological activity of LYCD became strongest under stress for 50℃ and 45 min.

Key words: liquor ; live yeast cell derivative ; high temperature technology ; Moutai Liquor

一般情况下,微生物处于极端环境中,为了生存,酵母细胞有很强的应激反应能力^[1]。首先要适应极端恶劣环境,在体内的基因水平和翻译水平上出现相应调节,酵母细胞很快就会合成许多具有自我修复性的保护性物质,抵抗极端环境,从而产生大量具有生物活性的活性酵母衍生物(以下简称 LYCD),具有抗氧化、抗衰老、刺激毛细血管再生、促进组织修复、镇痛以及减低紫外线辐射下细胞损伤等多种作用^[2-5];并且还能通过皮肤细胞的初生蛋白增加水分的吸收,帮助皮肤利用氧气,使皮肤富含水分等作用,广泛应用于药品、保健品、化妆品等领域^[6-8]。在国内,茅台酒中富含多种对人体有益的微量成分引起了人们的广泛关注^[9],但其产生机制目前尚不清楚。高温堆积发酵是茅台酒生产的特殊工艺之一,为了探讨茅台酒高温工艺应激条件对 LYCD 的影响,开

展了本研究。

1 材料和方法

1.1 菌种

酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)MT281(LYCD 制备菌株),从茅台酒生产酒醅中分离,最适生长温度为 35~37℃,致死温度为 54℃;酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)ATCC18824(生物活性测定菌株),模式菌株,中国科学院国家菌种保育中心提供,最适生长温度为 28~32℃。

1.2 培养基

麦芽汁培养基(12 Brix 麦芽汁)

1.3 实验方法

1.3.1 LYCD 制备:将酿酒酵母 MT281 摇瓶培养到对数

基金项目:中国博士后科学基金资助项目(2004036364)。

收稿日期:2005-01-24

作者简介:季克良(1939-),男,江苏省通州市人,我国著名白酒专家,教授,博士后导师。中国贵州茅台酒厂有限责任公司董事长、总工程师,中国食品工业协会白酒专业协会常务理事,贵州省酿酒工业协会会长,获国务院政府特殊津贴专家,有突出贡献的中青年专家,全国酿酒行业特殊贡献奖获得者,发表论文数十篇。

期,温度 50℃继续培养,不同时间收集酵母细胞,液氮超低温冷冻破壁,提取 LYCD。

1.3.2 酵母提取物(Yeast Extract, YE)的制备:取未经高温刺激处理的酵母细胞,依照 LYCD 方法制备 YE。

1.4 LYCD 生物活性测定

1.4.1 LYCD 促呼吸作用的测定:将新鲜培养的酿酒酵母 ATCC18824 细胞制成一定浓度的菌悬液,平均分为 10 份,随机分为两组,每组 5 份;实验组各加入 LYCD 1 mL,对照组各加入 YE 1 mL,采用瓦勃氏呼吸法,测定反应中 CO₂ 的释放量^[10],反映 LYCD 的生物活性。

1.4.2 酵母细胞存活率测定:将上述两组菌悬液继续培养至 72 h,美兰染色 5 min 观察,每张片上选择 5 个区域,每个区域计数 100 个酵母细胞,统计出存活率。

1.5 统计学分析

数字均用均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示,数字用 SPSS10.0 软件 t 值检验 $p<0.05$ 为差异有显著性。

2 实验结果

2.1 不同高温应激温度对 LYCD 的影响

实验组在 45~54℃条件下刺激 30 min,检测 LYCD 活性。当刺激温度为 45~50℃时,实验组 LYCD 活性逐渐增强,47℃差异开始具有显著性,50℃活性达到最高,为 191.2 μL/mL,差异最大(见图 1)。随后差异和活性逐渐下降。细胞存活率随着刺激温度升高逐渐减少,48℃后差异开始具有显著性,结果见图 2,表 1。

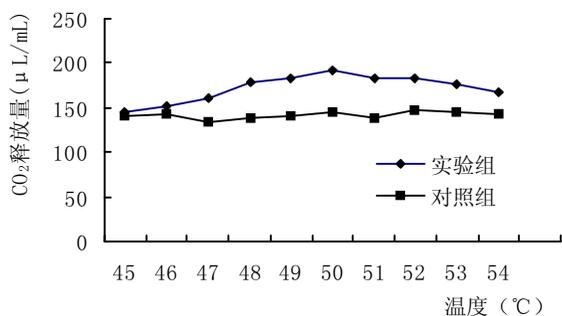


图 1 不同应激温度对 LYCD 活性影响

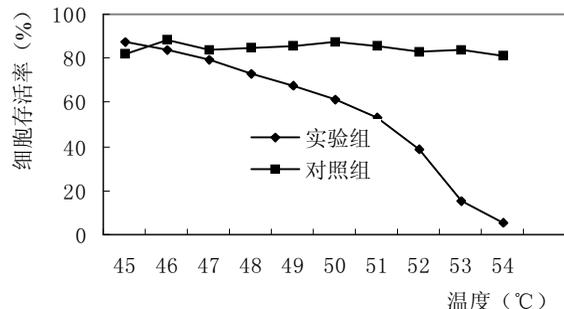


图 2 不同应激温度对酵母细胞存活率影响

2.2 不同高温应激时间对 LYCD 的影响

表 1 不同应激温度 CO₂ 释放量和细胞存活率

温度 (°C)	CO ₂ 释放量 (μL/mL)		细胞存活率 (%)	
	实验组	对照组	实验组	对照组
45	146.6±20.2 ^a	141.2±18.3	87.3±9.5 ^a	82.4±10.6
46	152.3±21.6 ^a	143.5±22.1	84.6±11.6 ^a	88.2±8.4
47	161.4±20.2 ^b	133.1±18.9	79.2±13.7 ^a	84.6±6.8
48	178.6±25.1 ^b	138.2±23.6	73.5±12.5 ^b	85.7±9.4
49	183.7±24.7 ^b	141.2±25.7	68.1±16.3 ^b	86.2±11.3
50	191.2±24.8 ^b	145.4±23.5	61.7±13.8 ^b	87.3±9.5
51	184.1±27.4 ^b	139.8±26.4	53.3±17.4 ^b	86.5±10.7
52	182.3±23.6 ^b	147.6±27.7	39.6±19.6 ^b	83.4±12.3
53	176.8±25.6 ^b	144.4±22.8	15.2±21.3 ^b	84.2±11.5
54	167.4±26.3 ^b	143.3±24.6	4.8±18.6 ^b	81.5±13.6

注: a: $p>0.05$; b: $p<0.05$

以 50℃刺激对数生长期的 MT281 酵母细胞,作用时间分别为 15 min, 30 min, 45 min, 60 min, 离心终止高温作用,无菌条件下取样检测酵母细胞存活率后,继续培养 60 min,制备 LYCD,测定不同刺激所得的 LYCD 的活性,结果表 2。

表 2 不同应激时间 CO₂ 释放量和细胞存活率

时间 (min)	CO ₂ 释放量 (μL/mL)		细胞存活率 (%)	
	实验组	对照组	实验组	对照组
0	134.5±18.3 ^a	132.6±20.4	86.5±6.8 ^a	87.1±7.9
15	146.6±21.4 ^a	141.2±19.3	83.2±9.3 ^a	85.3±8.2
30	161.3±23.5 ^b	133.5±22.5	78.6±7.2 ^a	81.6±10.5
45	192.4±20.2 ^b	128.7±18.7	65.1±11.4 ^b	79.3±9.6
60	184.6±24.5 ^b	135.2±21.7	51.4±13.2 ^b	73.8±11.4

注: a: $p>0.05$; b: $p<0.05$

经过 50℃刺激,由于刺激时间不同,所得的 LYCD 的生物活性也不同,在 0~45 min 内,随着作用时间的延长,LYCD 活性逐渐增强,30 min 时差异开始具有显著性,45 min 时活性达到最高;随后,LYCD 活性差异和活性开始降低(见图 3)。如图 4 所示,细胞存活率随刺激时间延长逐渐减少,45 min 后差异开始具有显著性。

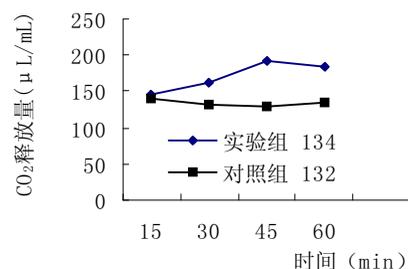


图 3 不同应激时间对 LYCD 活性影响

3 讨论

温度是影响生物细胞活动的重要因子之一,热应激反应是目前人们非常感兴趣的课题。茅台酒高温堆积发酵温度一般为 46~50℃,本实验所采用刺激温度为 45~54℃,与茅台酒生产发酵温度范围基本一致,超过一般

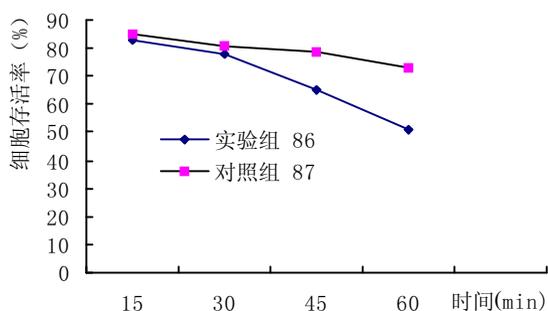


图4 不同应激时间对酵母细胞存活率影响

酿酒酵母生长的极端温度(>45℃)。瓦勃氏呼吸法测定反应中CO₂的释放量是反映LYCD的生物活性常用方法,已被国内外科学家广泛采用^[2,5,6,8,10]。实验选用的LYCD制备菌株是茅台酒生产酒醅中分离的功能菌,在温度为46~54℃进行不同时间刺激,所得到的LYCD加入到模式菌株的培养液后,其CO₂释放量逐渐增加,说明在茅台酒高温发酵条件下,能有效地刺激酿酒酵母MT281产生LYCD,并且与刺激温度和作用时间有关;当温度和作用时间超过一定范围后,LYCD活性逐渐减少,这可能与亚致死高温状态下酵母细胞存活率降低有关。

综上所述,茅台酒高温发酵温度能促进茅台酒生产酒醅中酿酒酵母产生具有生物活性的LYCD,高温制酒工艺可能是产生茅台酒中对人体有益成分的重要机制;实验结果也充分说明茅台酒堆积发酵顶温控制在50℃左右是非常合理的。

参考文献:

- [1] Marcos DDP, and Anita D. Pane. Acquisition of Tolerance against Oxidative Damage in *S.cerevisiae*[J] Microbiology, 2001 (1): 1-11.
- [2] Bronzetti G, Cini M, Andreoli E, Caltavuturo L. Protective Effects of Vitamins and Selenium Compounds in Yeast[J] Mutat Res, 2001 496(1-2): 105-115.
- [3] Verma NC, Singh RK. Stress-inducible DNA Repair in *Saccharomyces cerevisiae*[J] Environ Patol Toxicol Oncol, 2001, 20(1): 1-7.
- [4] Lou Y, Yousef AE. Adaptation to Sublethal Environmental Stresses Protects *Listeria monocytogenes* against Lethal Preservation Factors[J] Appl Environ Microbiol. 1997 63(4): 1252-1255.
- [5] GT Brooks, HA Schueffer. Live Yeast Cell Derivative[J] Cosmetics & Toiletries, 1995, 7(110):65-68.
- [6] Crowe MJ, McNeill RB. Topical Application of Yeast Extract Accelerates the Wound Healing of Diabetic Mice[J] J Burn Care Rehabil. 1999, 20(2):155-162.
- [7] Li A, Schuermann D, Gallego F, Kovalchuk I, Tinland B. Repair of Damaged DNA by Arabidopsis Cell Extract[J] Plant Cell 2002, 14(1): 263-273.
- [8] Goldman SA, Siegfried J, Scoleri P. The Effect of Acidic Fibroblast Growth Factor and Live Yeast Cell Derivative on Tympanic Membrane Regeneration in a Rat Model[J] Otolaryngol Head Neck Surg 1997, 117(6):616-21.
- [9] 程明亮, 吴君, 张文胜, 等. 茅台酒对肝脏的作用及其影响的实验研究[J] 中华医学杂志, 2003 83(3):237-241.
- [10] 马超颖, 戚薇, 路福平, 等. 活性酵母细胞衍生物的初步研究[J] 微生物学通报, 2003 30(3):26-28.

安琪酵母高科技打造亚洲第一

本刊讯:安琪酵母16年坚持不懈,以技术进步提升企业的核心能力,成长为中国酵母行业的排头兵,安琪酵母也成为享誉亚洲的酵母第一品牌。

安琪酵母股份公司的前身原本只是一家酵母工业性试验基地,建成于1989年。安琪从建成的第一天起,就深入实际,解决生产生活中的实际困难。在这一过程中,企业不断发展壮大。2000年成为同行业唯一一家高科技上市公司。目前,以35000吨的生产规模居亚洲第一,2002年安琪商标被国家工商总局认定为中国驰名商标,安琪还是“国家酵母技术研究推广中心”、“博士后科研工作站”;多次荣获国家科技进步奖等奖励。

针对我国是一个酿酒大国、粮耗高的特点,1991年,安琪公司利用引进的高活性干酵母生产技术、装备,开发了酿酒高活性干酵母,在短短几年内,推广到白酒、酒精、果酒生产中,极大地提高了粮食的利用率,推动了酿酒行业的技术革命。2004年,安琪和国际大公司展开竞争,率先开发了适应浓醇发酵的超级酒酵母,再次走在行业前列。

中国市场面包的糖分多,需要耐高糖的面包干酵母。安琪酵母依托湖北省科技攻关项目,经过长达5年的研究,开发出了“处于国内领先、国际先进水平”的耐高糖酵母。

酵母抽提物是安琪依托承担的国家“九五”科技攻关项目开发的产品。目前,安琪酵母已建成了亚洲规模最大、技术装备具有国际领先水平的年产5000吨酵母抽提物生产线,产品出口到多个发达国家和地区。

近10年,安琪酵母销量始终保持着30%的增长速度,远销到60多个国家和地区。2004年1~11月,该公司主导产品酵母销量增长40%,外贸出口1090万美元,同比翻了一番。(李成群)