

# 野生酿酒酵母耐受性分析

薛军侠, 徐艳文, 杨莹, 刘延琳

(西北农林科技大学葡萄酒学院, 陕西 杨凌 712100)

**摘要:** 对野生酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 的工业胁迫条件, 包括高浓度酒精、高渗透压、高温、高糖浓度和营养饥饿的耐受性进行了分析。结果表明, 所测定的酵母菌株对这些逆境条件的耐受性有明显差别, 表现出良好耐受性的是 C242 和 G2257, 耐受性差的有 C190 和 N5254。

**关键词:** 微生物; 野生酿酒酵母; 耐受性; 发酵

中图分类号: TS261.1; Q93-3 文献标识码: A 文章编号: 1001-9286(2007)06-0045-03

## Investigation on the Tolerance of Wild *Saccharomyces cerevisiae*

XUE Jun-xia, XU Yan-wen, YANG Ying and LIU Yan-lin

(College of Enology, Northwest A&F University, Yangling, Shanxi 712100, China)

**Abstract:** The tolerance of *saccharomyces cerevisiae* strains against high concentration ethanol, high osmotic pressure, high temperature, high sugar concentration and nutrient starvation were investigated. The results showed that there was evident difference in tolerance among all the measured *saccharomyces cerevisiae* strains, C242 strain and G2257 strain presented good tolerance, whereas the tolerance of C190 strain and N5254 strain was inferior.

**Key words:** microbe; wild *saccharomyces cerevisiae*; tolerance; fermentation

对微生物,特别是野生菌株的基本性状的了解是工业生产及分子生物学改造的基础。酿酒酵母因其具有良好的发酵性能,广泛地应用于葡萄酒酿造工业中。酿酒酵母在工业生产过程,难免受到胁迫条件<sup>[1-7]</sup>,如高酒精毒性、高糖浓度的影响,菌株对胁迫条件的耐受能力直接影响到工艺过程、发酵程度、发酵结果、产物成分等,从而影响经济效益。掌握菌株对胁迫条件的耐受性是进行工业生产的基础。目前,对于酵母耐受性与其发酵力,以及各耐受性间的相互关系已有相关报道<sup>[8]</sup>。本文就分离自宁夏地区的野生酿酒酵母进行胁迫条件耐受性分析研究,为野生菌株进行工业生产应用提供依据。

### 1 材料与方法

#### 1.1 菌株

实验用菌株均为分离自宁夏地区野生酿酒酵母,本实验室保存。

编号 CY 为工业干酵母,来自 LALVIN 公司。

#### 1.2 培养基

YPD 培养基: 1%酵母浸粉, 2%葡萄糖, 2%蛋白胨, pH 自然, 121 灭菌 20 min。

#### 1.3 耐受性分析<sup>[2,4]</sup>

酵母的耐受性分析是根据菌种在含有不同浓度的测试物质的 YPD 固体及液体培养基中生长状况进行分析的。接种新鲜菌落于 YPD 液体培养基中, 25 培养 24 h 后, 取 200  $\mu$ L 接入 5 mL 含有不同浓度抑制剂的 YPD 培养基中, 25 培养 1~3 周。观察生长状况。

##### 1.3.1 酒精耐受性测定

在酒精含量为 10 %vol、12 %vol、14 %vol、16 %vol 和 18 %vol 的 YPD 固体平板上进行生长实验, 一周后以生长状况表征其酒精耐受性。

##### 1.3.2 渗透胁迫耐受性测定

在含 0.7 mol/L、1.0 mol/L、1.2 mol/L、1.4 mol/L、1.6 mol/L、1.8 mol/L、2.0 mol/L、2.2 mol/L 和 2.4 mol/L KCl 的 YPD 液体培养基上进行生长实验, 以生长状况表征其渗透胁迫耐受性。培养 2 d 后以生长状况表征其耐受性。

##### 1.3.3 高温耐受性测定

在 37 和 42 下, 进行 YPD 斜面培养生长实验, 以生长状况表征其高温耐受性。培养两周后以生长状况表征耐受性。

基金项目: 西北农林科技大学青年骨干基金。

收稿日期: 2007-03-26

作者简介: 薛军侠(1977-), 女, 陕西人, 硕士研究生, 研究方向为发酵微生物。

通讯作者: 刘延琳, 教授, 博士生导师, 研究方向为酿酒微生物。

1.3.4 营养饥饿耐受性测定

将各菌株在无菌水中 25℃ 分别静置饥饿 5 d、6 d、7 d、8 d、9 d 和 10 d, 在 YPD 液体培养基上进行生长实验, 培养 2 d 后以生长状况表征其营养饥饿耐受性。

1.3.5 高糖耐受性测试

在含有 5%、10%、20%、30%、40%、50% 和 60% 的葡萄糖的 YPD 斜面培养基上进行生长实验, 以生长状况表征其对高浓度糖的耐受性。培养两周后观察生长差异性。

1.3.6 低 pH 值的耐受性测试

在 pH 值分别为 1.5、2.0、2.5、3.0、3.5、4.0 和 4.5 的 YPD 液体培养基中进行生长试验, 以生长状况表征其对低 pH 值的耐受性测试。培养 2 d 后观察生长差异性。

2 结果与分析

2.1 野生酵母高浓度酒精和高渗透胁迫耐受性测定

酿酒酵母对高浓度酒精和高渗透胁迫的耐受性是葡萄酒生产中的重要特性, 酿酒酵母对高渗透胁迫和高浓度酒精的强耐受性可以使发酵完全、彻底, 显著提高葡萄酒的酒精度, 可以进一步提高葡萄酒的品质。酒精对细胞的抑制作用很复杂, 主要表现在抑制酵母的增殖速度、存活性和发酵力 3 个方面<sup>[5,9]</sup>。各菌株对不同浓度酒精耐受性表明, 野生酿酒酵母普遍能耐受 10% 酒精, 少数不能耐受 12% 酒精, 耐受能力较强的最多能耐受 14% 酒精, 高于此浓度菌株不能存活。培养一周后可观察到有生长现象。结果见表 1。

表1 菌株对高浓度酒精耐受性测试结果

编号	酒精浓度(%vol)				
	10	12	14	16	18
N5238	+++	+	+	—	—
N5254	*	—	—	—	—
N5262	+	—	—	—	—
N6254	+++	+	—	—	—
C157	+	+	+	—	—
C158	+++	+	—	—	—
C190	*	—	—	—	—
C242	+	+	+	—	—
C372	+++	+	+	—	—
C693	*	+	—	—	—
C720	*	—	—	—	—
CY	++	+	+	—	—
G2257	+	+	+	—	—
T224	+	+	+	—	—

注: \*表明有微量生长, +表明生长, +++表明大量生长, —表明不生长。下同。

在浓醪发酵时, 发酵液渗透压较高, 引起细胞内水分活度、细胞质组成均发生显著变化, 酵母的细胞膜和菌体内的酶受到破坏, 从而抑制酵母的生长和发酵<sup>[10,11]</sup>。表 2 为菌株对渗透压耐受性测试结果。

表 2 表明, 野生酿酒酵母普遍能耐受 1.8 mol/L KCl

表2 菌株对渗透压耐受性测试结果

编号	KCl(mol/L)							
	1.0	1.2	1.4	1.6	1.8	2.0	2.2	2.4
N5238	+	+	+	+	*	*	—	—
N5254	+	+	+	+	+	—	—	—
N5262	+	+	+	+	+	*	*	—
N6254	+	+	+	+	*	—	—	—
C157	+	+	+	+	+	—	—	—
C158	+	+	+	+	*	+	—	—
C190	+	+	+	+	+	+	—	—
C242	+	+	+	+	+	+	+	+
C372	+	+	+	+	+	—	—	—
C693	+	+	+	+	+	+	*	—
C720	+	+	+	+	+	+	—	—
CY	+	+	+	+	+	—	—	—
G2257	+	+	+	+	*	*	*	—
T224	+	+	+	+	+	+	—	—

浓度, 有个别菌株能耐受 2.2 mol/L 浓度, 仅有 C242 能耐受 2.4 mol/L 渗透压浓度。

2.2 菌株对高温的耐受性测试

在葡萄酒生产过程中, 使用热浸渍发酵(通常超过 70℃)能改善某些葡萄酒的结构和香气, 加速反应进程, 减少冷却能耗, 提高代谢率, 缩短发酵周期<sup>[6,12]</sup>。选育优良的耐高温菌株是实现该工艺的前提。野生酿酒酵母在 37℃ 只有 N5254、C190 不能生长, 其他都耐受 37℃; 而只有 C242、C720 能够耐受 42℃, 其他菌株都不能生长。培养两周后观察生长现象。

表3 菌株对高温耐受性测试结果

菌株编号	温度(℃)		菌株编号	温度(℃)	
	37	42		37	42
N5238	+	—	C242	+	+
N5254	—	—	C372	+	—
N5262	+	—	C693	+	—
N6254	+	—	C720	+	+
C157	+	—	CY	+	—
C158	+	—	G2257	+	—
C190	—	—	T224	+	—

2.3 菌株对营养饥饿耐受性测试

随着发酵过程的进行, 营养物质的消耗会影响微生物发酵能力, 酿酒酵母对营养饥饿耐受性是葡萄酒工艺生产所要求的良好性质。一般地, 营养饥饿胁迫主要发生在发酵后期。表 4 为菌株对营养饥饿耐受性测试结果。其结果表明, 所有菌株均能够耐受 10 d 以上饥饿仍能生长良好。

2.4 高糖耐受性测试

葡萄酒工业中, 糖是酒精发酵的基质, 也是酵母赖以生活的能源物质。但是高浓度的糖对酵母有抑制作用——葡萄糖阻遏和葡萄糖抑制作用。而且, 高渗透压会导致酵母细胞水分流失, 活性降低。此外, 当培养基中糖浓度较高时, 系统粘度较高, CO<sub>2</sub> 释放慢。酵母酒精耐

表4 菌株对营养饥饿耐受性测试结果

编号	时间(d)					
	5	6	7	8	9	10
N5238	+	+	+	+	+	+
N5254	+	+	+	+	+	+
N5262	+	+	+	+	+	+
N6254	+	+	+	+	+	+
C157	+	+	+	+	+	+
C158	+	+	+	+	+	+
C190	+	+	+	+	+	+
C242	+	+	+	+	+	+
C372	+	+	+	+	+	+
C693	+	+	+	+	+	+
C720	+	+	+	+	+	+
CY	+	+	+	+	+	+
G2257	+	+	+	+	+	+
T224	+	+	+	+	+	+

表6 菌株对低pH值耐受性测试结果

编号	pH						
	1.5	2.0	2.5	3.0	3.5	4.0	4.5
N5238	—	+	+	+	+	++	+
N5254	—	+	+	+	+	++	+
N5262	—	+	+	+	+	++	+
N6254	—	+	+	+	+	++	+
C157	—	+	+	+	+	++	+
C158	—	+	+	+	+	++	+
C190	—	+	+	+	+	++	+
C242	—	+	+	+	+	++	+
C372	—	+	+	+	+	++	+
C693	—	+	+	+	+	++	+
C720	—	+	+	+	+	++	+
CY	—	+	+	+	+	++	+
G2257	—	+	+	+	+	++	+
T224	—	+	+	+	+	++	+

受性的降低可能是 CO<sub>2</sub> 的毒性所致。菌株对高糖耐受性测试结果见表 5。

表5 菌株对高糖耐受性测试结果

编号	葡萄糖浓度(% , v/v)					
	10	20	30	40	50	60
N5238	+	+	+	+	+	—
N5254	+	+	+	+	+	—
N5262	+	+	+	+	+	—
N6254	+	+	+	+	+	—
C157	+	+	+	+	+	—
C158	+	+	+	+	+	—
C190	+	+	+	+	+	—
C242	+	+	+	+	+	—
C372	+	+	+	+	+	—
C693	+	+	+	+	+	—
C720	+	+	+	+	+	—
CY	+	+	+	+	+	—
G2257	+	+	+	+	+	—
T224	+	+	+	+	+	—

表 5 表明, 野生酿酒酵母能够耐受 50% 以下的葡萄糖浓度, 但是均不能耐受 60% 葡萄糖浓度。培养 2 周后可观察到有生长现象。

### 2.5 低 pH 值耐受性测试 表 6

pH 值是影响酵母生长的重要因素, 野生酿酒酵母对 pH 的耐受范围相当广泛。表 6 表明, 在 pH 为 1.5 时不生长; 在 pH 为 2.0 时, 生成红褐色的沉淀。其他酸度均能够生长良好, 尤其在 pH 为 4 时。因此, 4.0 的酸度最适合酵母生长。

### 3 结论

综合以上实验, 不同酵母菌株对这些胁迫条件的耐受性有很大差异。为将这些菌株应用于工业生产提供了依据。通过耐受性实验表明: 野生酿酒酵母普遍能够耐受 10% vol 酒精, 不能耐受 16% vol 酒精; 普遍能耐受

1.8 mol/L 的渗透压; 只有 N5254、C190 不能耐受 37 温度, 仅有 C720 能够耐受 42 ; 野生酿酒酵母能够耐受至少 10 d 以上的营养饥饿。所有野生酿酒酵母均能够耐受 50% 以下高糖浓度, 不能耐受 60% 高糖浓度; pH 值为 1.5 时不能生长, pH 值为 2 时, 沉淀为红褐色, 其他 pH 时都能够生长。

### 参考文献:

- [1] ATTFIELD P.V. Stress tolerance: the key to effective strains of industrial baker's yeast[J]. Nat Biotechnol, 1997, 15 (13): 1351- 1357.
- [2] 刘向勇, 张小华, 鲍晓明. 酿酒酵母工业菌株胁迫条件耐受性分析[J]. 中国酿造, 2006, (1): 8- 11.
- [3] 薛颖敏, 江宁. 酿酒酵母 X330 高浓度发酵时耐酒精性能的初步研究[J]. 生物工程学报, 2006, (3): 508- 513.
- [4] 吴帅, 肖冬光, 原通磊, 赵旭. 高耐性酿酒酵母菌种的筛选[J]. 酿酒科技, 2006, (9): 37- 40.
- [5] 王滨, 张国政, 路福平, 等. 酵母酒精耐性机制的研究进展[J]. 天津轻工业学院学报, 2001, (1): 18- 22.
- [6] 李洪刚. 耐高温活性鲜酵母在酒精发酵生产上的应用[J]. 酿酒科技, 1994, (4): 44- 45.
- [7] 梅从笑, 方元超, 工福荣. 啤酒酵母的改良途径[J]. 食品工业科技, 2000, (3): 70- 72.
- [8] ZUZUARREGUI A, DEL O M. Analyses of stress resistance under laboratory conditions constitute a suitable criterion for wine yeast selection[J]. Antonie van Leeuwenhoek, 2004, 85: 271- 280.
- [9] G.P. CASEY, W. M. Ingledew[J]. CRC Crit. Rev. Microbiol. 1986, (13): 219.
- [10] CHEN C.S. Water activity-concentration models for solutions of sugars, salts and acids[J]. Journal of Food Science, 1989, 54: 1318- 1321.
- [11] YU BQ, ZHUGE J. Hyperosmotic adaptation of yeast cells and intracellular accumulation of glycerol[J]. China Biotechnology, 2003, 23(2): 25- 28.
- [12] 李华. 现代葡萄酒工艺学[M]. 西安: 陕西人民出版社, 2000.