

红四氮唑在酒精酵母选育中的应用效果研究

陈卫平,涂 谨,熊建华,张凤英

(江西农业大学食品系,江西 南昌 330045)

摘 要: 用红四氮唑作为指示剂筛选得到一株产酒精能力较强的酵母 Y_2 ,同原始菌 Y_1 相比,它细胞个体大,且大小均一、形状规则统一,呈长卵圆形,出芽率高,生长快,死亡率低。在同样的发酵条件下,它的发酵速度更快,酵母菌耐酒精能力更强,对原料的利用率更高,产酒精能力更强。

关键词: 红四氮唑; 酒精酵母; 选育; 应用

中图分类号: TS261.1; TQ920.1

文献标识码: A

文章编号: 1001-9286(2003)06-0035-03

Research on Application Effect of TTC in Breeding of Alcohol Yeast

CHEN Wei-ping, TU Jin, XONG Jian-hua and ZHANG Feng-ying

(Jiangxi Agricultural University, Nanchang, Jiangxi 330045, China)

Abstract: A yeast Y_2 which had higher ability of producing alcohol was gained by using TTC as indicator. Compared with the original yeast Y_1 , it's cell was bigger, regular and had an oval shape, higher gemmative proportion, higher growing speed and lower death rate. At the same fermentative conditions, the yeast Y_2 had higher fermentative rate, higher utilization of material, stronger ability of enducing alcohol and producing alcohol.

Key words: TTC; alcohol yeast; breeding; application

红四氮唑,全称2,3,5-氯化三苯基四氮唑,简写TTC,它是一种显色指示剂,原是无色的,由于活菌中所含脱氢酶可将它还原成红色的TF,可使平板上原先看不太清楚的微小菌落染成肉眼清晰可见的红色菌落^[1],且通过它呈色的深浅可判断酵母中呼吸酶活力的大小,即酵母产酒精能力的高低。产酒精能力强的酵母会显现深红色,次之显粉红色、微红色或不显色^[2]。生产用酒精酵母若经干代的转接保藏,往往会出现酵母的生产性能衰退或酵母细胞性能良莠不齐的现象。另外,由于有些企业的无菌操作设施条件有限,在传代保存操作中甚至会污染杂菌。接种这样的酒精酵母发酵后,进入主发酵的时间延长,易感染杂菌,耗糖速度慢,生酸较多,导致酒的品质降低。因此,寻找一种快速、有效、简便的分离、选育、复壮酒精酵母的方法是非常必要的。经研究发现,经过TTC显色平板筛选得到的酵母细胞个体大、大小均一、形状规则统一,呈长卵圆形,出芽率高,生长快,死亡率较低,在同样的发酵条件下,它的发酵速度更快,耐酒精能力更强,对原料的利用率更高,产酒精能力更强,且成品酒的品质也较好。从而证明用红四氮唑作为指示剂筛选酒精酵母的方法是有效的,在实际生产中可提高酒精酵母的分离选育效率,降低实验成本。

1 实验材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 下层培养基:葡萄糖5.05 g,蛋白胨1.0 g,酵母膏0.75 g,磷酸二氢钾0.5 g,硫酸镁0.2 g,柠檬酸0.135 g,琼脂10 g。

1.1.2 TTC上层培养基:TTC 0.03 g,葡萄糖3 g,琼脂2 g。

1.1.3 麦芽汁琼脂斜面培养基:麦芽汁,琼脂。

1.1.4 制作酵母曲的原料:麸皮,水,米粉。

1.1.5 原始酒精酵母种 Y_1 :本系实验室保藏。

1.2 实验方法

1.2.1 下层平板的制备

分别称取上述材料→加入500 ml水→溶解→杀菌→倒平板

1.2.2 TTC上层平板的制备

分别称取葡萄糖、琼脂→加入100 ml水→在沸水中加热溶解→灭菌→在水浴50℃左右以无菌操作加入TTC→溶解→倒平板

1.2.3 麦芽汁的制备见参考文献[3]。

1.2.4 产酒精能力强的酵母的筛选

将原始酵母菌液用无菌水稀释到 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} 5个梯度,接种到下层平板上,30℃倒置培养40 h,选择菌落数为30~100的平板,往里倒入约10 ml TTC上层培养基覆盖原有菌落,30℃下闭光保温2~3 h,由菌落呈色的深浅来判定酵母产酒精能力的大小,挑选颜色较深的菌落接种到试管斜面麦芽汁培养基上,然后测定原始菌 Y_1 与筛选菌 Y_2 的细胞的形态结构、生长曲线、耐酒精能力、产酒精能力等酵母生产特性,以确定TTC在酒精酵母选育中的应用效果。

1.2.5 酵母生长曲线的测定

将试管培养的原始菌和筛选菌分别接种到麦芽汁三角瓶中培养,每隔3 h测1次酵母细胞数,到细胞数开始减少为止。

1.2.6 酵母菌耐酒精能力的试验见参考文献[3]。

1.2.7 酵母曲的制备

称取麸皮500 g→加入250 ml水→混匀→过筛→加入少量米粉→隔水蒸40 min→冷却
→分装入两个托盘 — $\left\{ \begin{array}{l} \text{一盘倒入培养16 h } Y_1 \text{ 酵母液} \\ \text{一盘倒入培养16 h } Y_2 \text{ 酵母液} \end{array} \right\}$ →加入少量根霉→保温保湿培养24 h→烘干备用

1.2.8 两种菌发酵失重的测定

收稿日期: 2003-05-13; 修回日期: 2003-09-08

作者简介: 陈卫平(1958-),男,江西人,学士,教授,发表论文30余篇。

分别称取200 g早米放入6个1000 ml三角瓶中,洗净,加入适量水浸泡4 h左右,煮熟,冷却后分别加入2 g根霉拌匀,糖化24 h后分成两组,分别加入上述两种酵母曲各1 g,加入240 ml水,混匀发酵,每12 h测重1次,直至不失重为止。

1.2.9 总酸、总酯、总醛、酒精度的测定见参考文献[4]。

2 结果与结论

2.1 出发菌的筛选(见图1、图2)

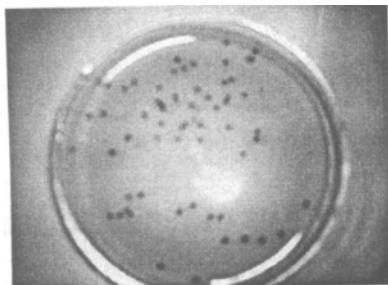


图1 原酵母菌Y₁的TTC显色图

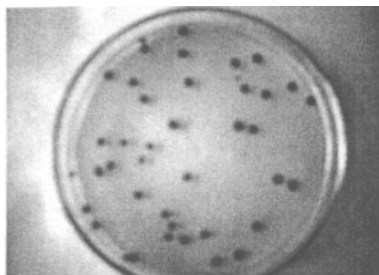


图2 筛选菌Y₂的TTC显色图

图1为原酵母菌Y₁的TTC平板显色图,从中可以看出它菌落大小不均一,颜色深浅不一,说明酵母的繁殖能力和产酒精能力参差不齐,在发酵过程中同步性较差。

图2为筛选菌Y₂的TTC平板显色图(在同样的培养时间内),与原始菌的TTC显色平板图相比可看出它菌落普遍比Y₁大、大小也较均一、颜色较深且深浅一致,这说明经TTC筛选得到的酵母生长代谢状况同步性较好。

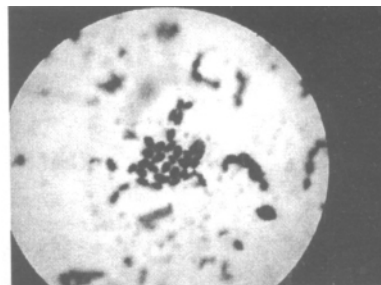
2.2 两株酵母菌的细胞形态结构的比较

将实验室保藏的原始菌种Y₁和筛选菌种Y₂分别接种到麦芽汁液体培养基中,培养16 h后测量两菌株的出芽率、死亡率、大小及数量。结果见表1、图3。

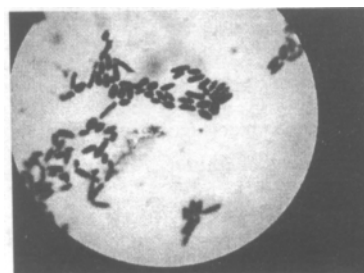
从表1可知,经筛选后的酵母菌出芽率比原始菌高出14.04%,死亡率低3.6%,细胞个体普遍增大,并且数量较多。说明经TTC筛选后的酵母菌细胞生命力强,能迅速生长繁殖,并且能有效地抑制杂菌的生长。

表1 酵母菌的出芽率、死亡率、大小及数量比较

菌种	出芽率(%)	死亡率(%)	大小(μm)	数量(千万)
原始菌	8.53	17.1	4~8.25×3.75~8	1.125
筛选菌	22.57	13.5	6~10×4.25~10	1.55



原酵母菌Y₁的细胞形态图



筛选菌Y₂的细胞形态图

图3 两株酵母菌单染色涂片显微镜图

图3为两菌株酵母菌的单染色涂片显微镜图,筛选菌的个体大、形状规则,大多数呈长卵圆形,刚分裂的芽体细胞多。而原酵母菌Y₁多呈短卵圆形,大小不均一,形状不够统一,刚分裂的芽体细胞少。

2.3 两株酵母菌耐酒精能力的比较

两株酵母菌耐酒精能力的比较结果见表2,从表2可知,筛选菌Y₂在酒精含量为10%以下的麦芽汁中能旺盛生长,在酒精含量19%的麦芽汁中还能微弱生长;而原始菌Y₁在酒精含量9%以下的麦芽汁中才能旺盛生长,在酒精含量18%的麦芽汁中就不能生长了;而且在酒精含量11%以上的麦芽汁中筛选菌Y₂的起酵时间普遍比原始菌Y₁要短1~2 h。由此可充分说明筛选菌Y₂的耐酒精能力比原始菌Y₁更强。

2.4 出发菌和筛选菌生长曲线的比较(见图4)

图4为两菌株的生长曲线,从图中可以看到,筛选菌的细胞繁殖速度较快,有明显的对数生长期,且生长旺盛,较晚近入衰亡期;而原始菌的细胞增殖较缓慢,没有筛选菌的代谢繁殖能力旺盛,且较早进入衰亡期。可见经过TTC筛选得到的酵母繁殖力强,生长迅速,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

表2 两株酵母菌耐酒精能力比较

菌号	麦芽汁中酒精含量(%)												
	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
Y ₁	+++	+++	++	++	+	+	+	+	0	0	0	0	0
起酵时间(h)	13	13	15	16	18	18	20	20					
Y ₂	+++	+++	+++	++	++	+	+	+	+	+	0	0	0
起酵时间(h)	13	13	15	15	17	17	19	19	20	20			

注:“+++”表示酵母生长旺盛,“++”表示酵母生长较好,“+”表示酵母生长微弱,“0”表示酵母不能生长。

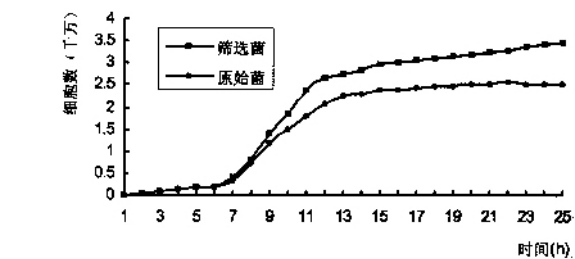


图4 两菌株生长曲线的比较

期,迅速发酵,缩短发酵时间,减少被杂菌污染的机会。

2.5 两菌株发酵失重的比较 (见图5)

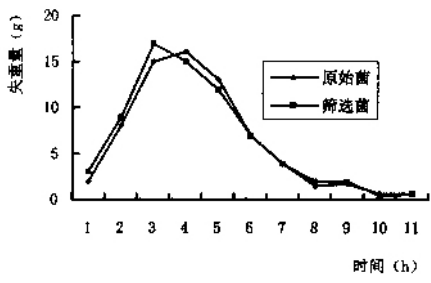


图5 两菌株的发酵失重的比较

筛选菌与原始菌的发酵失重情况见图5,从图中可以看出,筛选菌Y₂与原始菌Y₁比较,发酵同样时间Y₂的失重速度更快,说明其产生的二氧化碳量更多,发酵起步早、速度快,能较早期地达到主发酵期,形成生长优势,有效地抑制杂菌,使发酵过程中的生化反应正常进行,能对白酒的质量有初步的保证。

2.6 两菌株所酿白酒的理化指标的检测

用两菌株Y₁和Y₂分别酿制白酒,将所得的酒样进行各项理化指标的测定。结果见表3,由表3可以看出,两者所酿酒各项理化指标均达到国家小曲酒的质量标准。两者总酯含量的差别不大,但用

表 3 成品酒的成分比较		
项目	原始菌 Y ₁	筛选菌 Y ₂
酒精度(%,v/v)	42.26	43.16
总酸(g/100 ml)	0.10	0.15
总酯(g/100 ml)	0.52	0.50
总醛(g/100 ml)	0.10	0.07
口感	有苦杂味	风味纯正,苦杂味较少
外观	酒液微浑	酒液清亮

筛选菌Y₂生产的白酒酒精度比Y₁高出0.9度,说明筛选菌Y₂发酵能力更强,对原料的利用率更高。适量的醛类对酒的香味起着一定的作用,但醛类物质多了不仅有一定的毒性,还会给酒带来苦杂味^[5],筛选菌Y₂所酿酒的总醛含量更低,其酒质也更好。

3 结论

3.1 用红四氮唑作为指示剂筛选得到的酒精酵母Y₂,同原始菌Y₁相比,它细胞个体大、大小均一、形状规则统一,呈长卵圆形,出芽率高,生长快,死亡率较低,在同样的发酵条件下,它的发酵速度更快,耐酒精能力更强,对原料的利用率更高,产酒精能力更强,且成品酒的品质也较好。从而证明用红四氮唑作为指示剂筛选酒精酵母的方法是有效的,在实际生产中可提高酒精酵母的分离选育效率,降低实验成本。

参考文献:

[1] 祖若夫,胡宝龙,周德庆.微生物学实验教程[M].上海:复旦大学出版社,1993.
[2] 王梅,张澎湃,帅桂兰. TTC在黄酒酵母选育中的应用[J]. 酿酒, 2001, (5): 62-64.
[3] 郝林.食品微生物学实验技术[M]. 北京:中国农业出版社, 2001.
[4] 欧阳琼.微生物学实验法[M].南昌:江西人民出版社,1980.
[5] 无锡轻工业学院,大连轻工业学院,天津轻工业学院. 工业发酵分析[M].北京:轻工业出版社,1999.

(上接第34页)

工艺大生产则更多的依赖纯种麦曲和纯种酒母,以便于生产管理及安全酿酒,但麦曲糖化力和酒母发酵力不如传统黄酒高。廉价的天然有机物植酸用于提高黄曲霉菌糖化酶活力无疑给酿酒业带来了福音,其是否也能提高酵母发酵力,而不影响黄酒色、香、味、体及各项理化指标,从而提高淀粉利用率,降低酒母和麦曲使用量,节约粮食,推动黄酒新工艺向前迈进,还有待于进一步研究探讨。

参考文献:

[1] Purva Vats, U.C. Banerjee. Studies on the production of phytase by a newly isolated strain of *Aspergillus niger* var teigham obtained from rotten wood-logs[J]. Process Biochemistry, 2002, 38: 211-217.
[2] 张素华,朱强,夏艳秋,等.蒲菜天然保鲜剂的筛选及其应用研究[J].扬州大学学报, 2002, 23(4): 75-78.
[3] Paivi Ekholm, Lissa Virkki, Maija Ylinen, et. The effect of phytic acid and some nature chelating agents on the solubility of mineral elements in oat bran[J]. Food Chemistry, 2003, 80: 165-170.
[4] J.R. Vraart, Y. Schouten, C. Gooijer, et. Evaluation of phytic acid as a buffer additive for the separation of proteins in capillary electrophoresis[J]. Journal of Chromatography, 1996, 768: 307-313.
[5] Rao RK, Eamakrishnan CV. Inositol phosphatase in developing rat duodenum, jejunum and ileum[J]. Biol Neonate, 1986, 50: 165-166.

[6] 李记明.酵母活性剂在葡萄酒酿造中的应用研究[J].酿酒科技, 2001, (4): 88-89.
[7] Selma H.A. Elyas, Abdullahi H. El Tinay, Nabila E. et. Effect of natural fermentation on nutritive value and in vitro protein digestibility of pearl millet[J]. Food Chemistry, 2002, 78: 75-79.
[8] 顾振新.酿造酒工艺学[M].北京:中国轻工业出版社,1996.
[9] 康明官.日本清酒技术[M].北京:轻工业出版社,1986.
[10] 李建武,陈来同,余瑞元,等.生物化学试验原理和方法[M].北京:北京大学出版社,1994.
[11] Reddy NR, Sathe SK, Salunkhe DK. Phytases in legumes and cereals[J]. Advanced Food Research, 1982, 82: 91-92.
[12] A.L. El-Batal, H. Abdel Kareem. Phytases production and phytic acid reduction in rapeseed meal by *Aspergillus niger* during solid state fermentation[J]. Food Research International, 2001, 34: 715-720.
[13] Larsson, M., Sandberg, A.-S. Phytate reduction in oats during malting[J]. Journal of Food Science, 1992, 57: 994-997.
[14] 龚士选.生物激素在凤型酒生产中的试验研究[J].酿酒, 1995, (1): 57-58.
[15] 吴谋成,袁俊华.植酸的毒理学评价和食用安全性[J].食品科学, 1997, 18(2): 46-49.