

发酵刺梨干红酵母菌的鉴定及优良菌株的筛选

谭书明¹, 曾海英^{2*}, 刘永翔³

(1. 贵州大学化学工程学院; 2. 贵州大学生命科学学院; 3. 贵州省农业科学院, 贵州 贵阳 550025)

摘要: 本试验对 8 株从法国引进发酵刺梨干红的酵母菌进行形态学、生理生化学及分子生物学分类鉴定; 并结合刺梨干红生产特点, 检测其发酵性能、抗逆性能等指标。经比较筛选出 RC212 号葡萄汁酵母 (*Saccharomyces uvarum*) 与 DV10 号汉氏德巴利氏酵母 (*Debaryomyces hansenii*) 两菌株, 其均表现出较强的发酵性能及生产适应性能, 为刺梨干红工业化生产技术研究提供了试验菌株。

关键词: 微生物; 酵母菌; 刺梨干红; 鉴定; 筛选

中图分类号: TS261.1 ; TS262.7 ; TS261.4 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-9286(2006)07-0020-05

Identification of Yeast for Fermented Rosa Roxburghii Tratt Claret & Screening of the Quality Strains

TAN Shu-ming¹, ZENG Hai-ying² and LIU Yong-xiang³

(1. College of Chemical Engineering; 2. College of Life Sciences, Guizhou University; 3. Guizhou Academy of Agricultural Science, Guiyang, Guizhou 550025 China)

Abstract: The morphological characteristics and phenotypic properties of 8 yeast strains introduced from France were studied in the experiment. Besides, its fermenting performance was also investigated in consideration of the production characteristics of Rosa roxburghii tratt claret. According to the physiochemical and microbacterial results of them, two strains No. RC212 (*Saccharomyces uvarum*) and DV10 (*Debaryomyces hansenii*) which presented powerful fermenting performance and good production conformability were selected as test strains for “ Industrialized Production Techniques Research of Rosa Roxburghii Tratt Claret ”.

Key words: microbe; yeast; Rosa roxburghii Tratt claret; identification; screening

刺梨 (*Rosa roxburghii* Tratt) 属蔷薇科野生植物, 分布于我国黔、川、浙、陕及东北三省。仅贵州省年产量就超过 15000 t, 野生资源十分丰富。刺梨果肉脆、甜酸, 富含 Vc, 据测定 Vc 高达 2054~2728 mg/100 g, 誉为 Vc 王。另还含有 V_P, V_D, V_E, β 胡萝卜素及蛋白质、氨基酸、多种微量元素等营养物质。近代又发现刺梨内含丰富的天然超氧化物歧化酶 (SOD)、胆碱等。20 世纪 80 年代以来, 大量的科学研究揭示了刺梨汁有防癌、抗衰老、降血脂、解铅毒、增强细胞免疫等多种重要生理功能^[1]。

为了把贵州省这一特色的资源优势变成经济优势, 生产刺梨干红不失为最佳的产品开发定位。因为其本身的酸、苦、涩等风味与干红的特性要求不谋而合, 再加之其风味高雅, 回味悠长, 浓而不腻, 具有高营养价值和高

保健功效, 因此刺梨干红是具有很强的市场竞争力和市场前景的产品之一。据此, 本课题对从法国引进的 8 株载体酵母菌株进行了形态学、生理生化学及分子生物学等方面的分类鉴定, 将其拟鉴定至种; 并结合刺梨干红工业化生产技术研究要求, 对试验菌株进行生产性能及抗逆性能研究, 以期筛选出优良菌株, 为刺梨干红生产提供试验菌株。

1 材料与方法

1.1 试验材料

试验菌株: EC1118, RC212, QA23, D47, 71B, R1, RA17, DV10 来源于法国 CALLEMAND ZNC 公司, 为淡黄色颗粒状载体酵母。试验编号为 1[#]~8[#] 菌株。

基金项目: 贵州省年度攻关课题(黔科合 2004NGY003)。

收稿日期 2006-05-24

作者简介: 谭书明 (1964-), 男, 副教授(硕士), 主要研究方向为农产品贮藏加工。

* 曾海英为通讯作者。

1.2 试验方法

1.2.1 微生物学鉴定

将试验菌株活化 3~4 代, 经检合格后, 进行形态学观察及生理生化检测, 结合传统鉴定方法^[2~12]及脉冲电泳核型分析^[13,14], 将菌株拟判定至种。

1.2.2 菌株生产性能检测

采用原汁发酵法、定期检测发酵期各理化指标及微生物指标^[15~20]。产酒度检测: 参照 GB2757- 81; 总酸测量: 参照 GB12293- 90; 有效酸的测量: 酸度计直接测定法; 还原糖的检测: 参照 GB5009.7- 85; 可溶性固形物测定: 折光法; 单宁含量测定: 鞣红滴定法; 酵母菌数检测:

参照 GB4789.15- 84。

2 结果与分析

2.1 酵母菌鉴定

2.1.1 形态学及生理生化鉴定

8 株酵母菌的形态及生理生化检测结果见表 1。

2.1.2 脉冲电泳核型分析

将 8 株酵母菌脉冲电泳图谱用 GeneTools Analysis Software- Version3.02.00 软件分析, 其结果见图 1。

2.2 酵母菌株拟鉴定结果

结合形态学、生理生化及脉冲电泳核型分析, 8 株发酵刺梨干红酵母菌株拟鉴定结果为 1[#] 和 4[#] 菌株属

表 1 形态学及生理生化鉴定结果

试验项目	酵母菌编号							
	1 [#]	2 [#]	3 [#]	4 [#]	5 [#]	6 [#]	7 [#]	8 [#]
菌落形态	均表现为乳白色、微突、不透明、湿润、边缘整齐的圆形菌落, 但菌落大小稍有差异							
有无子囊孢子	有	有	无	有	无	无	有	有
有无形成假菌丝	原始菌丝	原始菌丝	树状	原始菌丝	原始菌丝	树状	原始菌丝	原始菌丝
有无掷孢子	无	无	无	无	无	无	无	无
葡萄糖	+	+	+	+	+	+	+	+
麦芽糖	+	+	+	+	+	+	+	—
半乳糖	+	+	+	+	+	+	+	+
棉子糖	+	+	+	—	+	+	—	+
蔗糖	+	+	+	+	+	+	+	+
阿拉伯糖	+	+	+	—	+	+	+	+
乳糖	+	+	+	+	+	+	+	+
木糖	+	+	+	+	+	+	+	+
肌醇	+	—	—	—	—	—	+	—
纤维二糖	+	—	—	—	—	—	+	—
蜜二糖	+	+	—	—	—	—	+	—
鼠李糖	+	—	—	+	—	—	+	—
琥珀糖	—	—	—	—	—	—	+	—
菊糖	+	+	+	—	+	+	+	+
山梨糖	—	+	+	—	—	+	+	—
柠檬酸	—	—	+	—	+	+	+	—
可溶性淀粉	+	+	+	+	+	+	+	+
甲醇	+	+	—	—	—	+	+	—
丙三醇	+	+	+	—	+	+	+	+
乳酸	+	+	—	+	+	+	+	—
硫酸铵	+	+	+	+	+	+	+	+
硝酸钾	+	+	—	+	+	+	+	—
10 %NaCl	—	—	—	—	—	—	—	—
产生类淀粉	—	—	—	—	—	—	—	—
1%醋酸的生长	+	+	+	+	+	+	+	+
石蕊牛奶试验	产微量酸	产微量酸	产微量酸	产微量酸	产微量酸	产微量酸	产微量酸	产微量酸
尿素分解	—	+	—	—	—	—	—	—
分解脂肪	+	+	+	+	+	+	+	+
明胶液化	—	—	—	—	—	—	—	—
产酸	微量	微量	微量	微量	微量	微量	微量	微量
产酯	微量	微量	微量	微量	微量	微量	微量	微量
在维生素培养基上的生长	++	++	++	++	++	++	++	++

注: “+”表示可以发酵或生长或可以分解; “—”表示不能发酵或不能生长或不分解; “—”表示弱阳性; “++”表示长势较好。能发酵葡萄糖, 就都能发酵果糖和甘露糖, 故发酵糖试验中只测定葡萄糖而未测后两种糖。

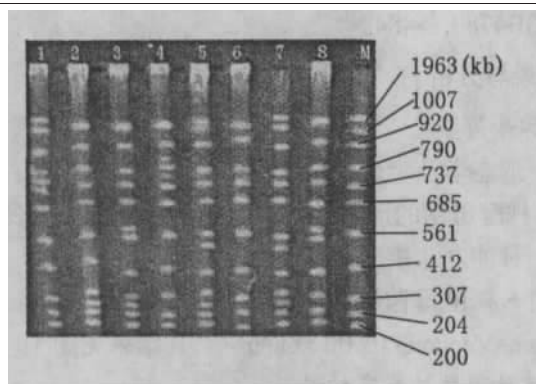


图1 8株酵母菌的 CHEF 电泳核型图谱

汉逊氏酵母属;5[#]和7[#]菌株为同种酵母菌,属白色球拟酵母;2[#]为酵母属葡萄汁酵母;3[#]和6[#]同属假丝酵母属;8[#]为汉氏德巴得氏酵母菌。8株酵母菌分类拟鉴定结果见表2。

表2 8株酵母菌拟鉴定结果

菌号	编号	鉴定结果
EC1118	1	异常汉逊酵母异常变种 <i>Hansenula anomala</i>
RC212	2	葡萄汁酵母 <i>Saccharomyces uvarum</i>
QA23	3	解脂假丝酵母解脂变种 <i>Candida lipolytica</i>
D47	4	土星汉逊酵母土星形变种 <i>Hansenula saturnus</i>
71B	5	白色球拟酵母 <i>Torulopsis candida</i>
R1	6	产阮假丝酵母 <i>Candida utilis</i>
RA17	7	白色球拟酵母 <i>Torulopsis candida</i>
DV10	8	汉氏德巴利氏酵母 <i>Debaryomyces hansenii</i>

3.1 产酒度检测

分别对8株酵母菌进行产酒试验,结果见图2。由图2可知,2[#],3[#],8[#]菌株产酒能力较强。5[#]菌株进入发酵后期,乙醇体积分数略有下降,分析可能与其可发酵性糖消耗殆尽,已生成的乙醇有部分发生进一步转化而被消耗所致有关。

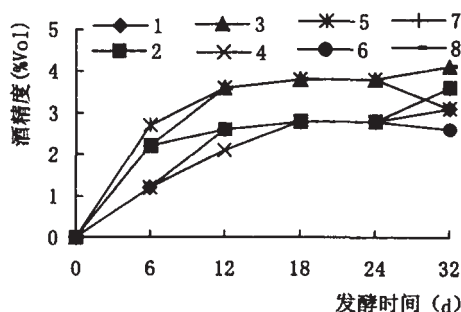


图2 8株酵母菌株产酒精曲线图

3.2 总酸的检测

酸度主要是受发酵品温的制约,温度越高,生酸越多。在发酵过程中应尽量减少酸的产生。8株酵母菌的产酸试验结果见图3。由图3可知,所有菌株在发酵前

期均有不同程度的生酸现象。且前期呈上升趋势,分析其原因,可能与固形物和酒精分解有关;发酵至中后期,部分酸被分解,酸度出现下降。1[#]菌株产酸量最多,于发酵24d后达到峰值。2[#],5[#],8[#]3株酵母菌主发酵后酸度均较低,这对目的产物的收集是相当有利的。

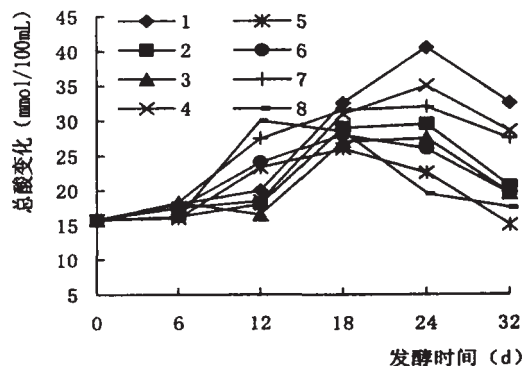


图3 8株酵母菌总酸变化图

3.3 有效酸的检测

伴随着有机酸的变化,pH也发生相应的改变(Czyzycki,1999),结果见图4。由图4可知,有效酸度变化没有总酸变化波动大,因为总酸中含有液态酸和挥发性酸,受影响因素较多。pH因为发酵液的缓冲作用,总体趋势较平稳,8株酵母菌株发酵体系中的pH均有所上升,发酵第6天达到峰值,这可能与酵母菌株代谢作用导致有机酸被大量利用有关。后期变化较平稳。

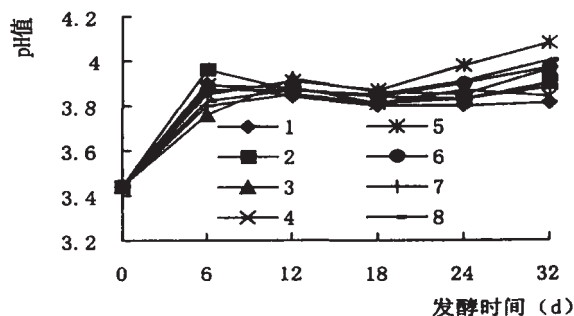


图4 8株酵母菌株有效酸的变化

3.4 还原糖的测量

在酒精发酵过程中,还原糖的变化微妙地反应了微生物对底物的利用能力及代谢产物的形成能力。因此对发酵期间还原糖的变化进行了监测,其结果见图5。在发酵前期,发酵液中还原糖含量随着固形物的不断溶出,出现波动性。但到发酵后期,固形物溶出量减少,还原糖的含量得不到补充,表现出下降趋势。另一方面,发酵体系中的残糖量直接衡量了发酵剂的发酵能力。发酵过程酵母菌的活力与发酵能力与可发酵底物的含量呈反比关系。经检测各发酵体系残糖量由低至高的发酵菌

株分别为 8[#], 2[#], 4[#], 3[#], 5[#], 6[#], 1[#], 7[#]。

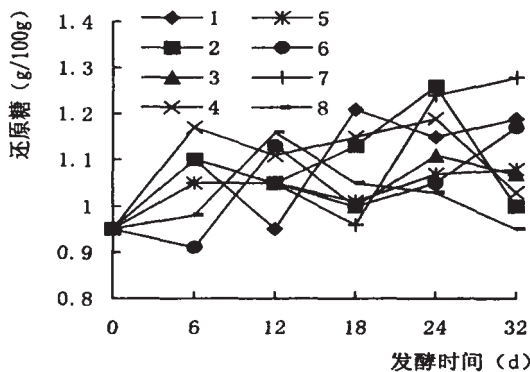


图5 8株酵母菌株还原糖的曲线变化图

3.5 可溶性固形物的测定

在整个发酵周期中,可溶性固形物总体呈下降趋势(见图6)。其中尤以 8[#], 5[#], 2[#] 菌种发酵体系的变化量最大,前后期都呈陡然下降趋势,中期略平稳。而 6[#] 菌株发酵体系固形物溶出较缓慢。

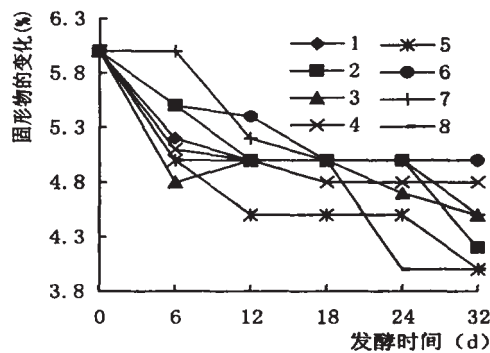


图6 8株酵母菌株可溶性固形物变化图

3.6 单宁含量的测定

刺梨果中单宁含量较高,其直接影响着刺梨干红的口感。对各发酵体系的单宁进行测定,结果见表3。

表3 8株酵母菌株单宁含量的测定结果 (%)

发酵时间 (d)	酵母菌株							
	1 [#]	2 [#]	3 [#]	4 [#]	5 [#]	6 [#]	7 [#]	8 [#]
0	1.23	1.23	1.23	1.23	1.23	1.23	1.23	1.23
6	0.90	1.16	1.07	0.78	0.95	0.90	0.98	0.91
12	1.26	0.87	1.06	1.02	1.13	0.96	1.18	1.24
18	0.88	0.86	0.91	0.74	0.86	0.99	0.78	0.89
24	1.03	0.90	1.05	1.02	1.07	1.10	0.97	1.10
32	1.05	0.95	1.31	1.36	1.31	1.35	1.29	1.10

发酵前期所有的试验中单宁的含量均有下降,到发酵后期,除 1 号外其余均比发酵前期含量有所增高。

3.7 酵母菌数的测定(见图7)

发酵前 6d 酵母菌数都呈陡然上升的趋势,此期为菌株细胞大量繁殖阶段。从发酵 6d 后进入到酿酒阶段,酵母菌开始发挥其‘产酒’功能,酵母菌数趋于动态

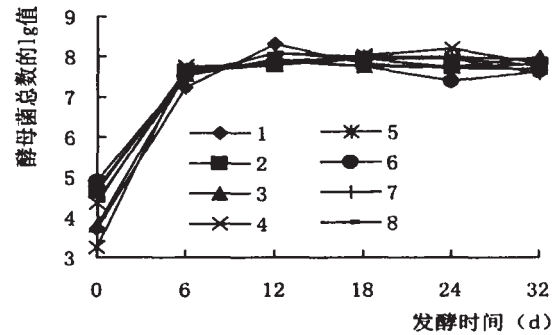


图7 发酵期8株酵母菌数曲线变化图

平稳期。发酵后期略有下降,这可能与菌体衰老及出现少量细胞自溶现象有关。

3.8 特殊生境生长实验(见表4)

表4 8种酵母菌株特殊生境生长实验结果 (%)

鉴定项目	酵母菌株							
	1 [#]	2 [#]	3 [#]	4 [#]	5 [#]	6 [#]	7 [#]	8 [#]
耐糖性(糖浓度 40%)	+	+	+	+	+	+	+	+
(糖浓度 50%)	+	+	+	+	+	+	+	+
(糖浓度 60%)	D	D	D	D	D	D	D	D
耐盐性(盐浓度 2%)	+	+	+	+	+	+	+	+
(盐浓度 6%)	+	+	+	+	+	+	+	+
(盐浓度 10%)	D	D	D	D	D	D	D	D
耐醋酸(醋酸浓度 4%)	+	+	+	+	+	+	+	+
(醋酸浓度 6%)	D	D	D	D	D	D	D	D
(醋酸浓度 8%)	-	-	-	-	-	-	-	-

注:“+”表 95 %以上的菌株为阳性;“-”表 95 %以上的菌株为阴性;“D”表 50 %以上的菌株为阳性。

从生产性能上,8 株酵母菌均能耐受 60 %的糖浓度、10 %盐浓度、小于 8 %的醋酸浓度,且生长温度在 8 ~55 °C 之间,尤以 22 ~25 °C 下生长最好,为其最适生长温度。较符合酿酒的特殊体系及生境。

4 结论

综上所述,通过 8 株发酵刺梨干红酵母菌原液的发酵试验,对发酵期理化指标及微生物学指标进行检测,分析各理化指标的动态变化与发酵剂酵母菌株之间的关系,比较筛选出发酵性能及抗逆性能均较优的菌株为:2[#] 与 8[#] 菌株,即 RC212 葡萄汁酵母(*Saccharomyces uvarum*) 与 DV10 号汉氏德巴利氏酵母(*Debaryomyces hansenii*)。其表现出高还原糖利用率和高产酒度特性;发酵周期适中,发酵体系中生酸少,残糖量低,单宁含量少,同时菌株也表现出较优的抗逆性能。这为‘刺梨干红工业化生产技术研究’提供了试验菌株。但要指出的是,这两株酵母菌若要投产试用,还应进一步进行扩大试验,并对其絮凝性、SO₂ 耐受性及菌株安全性等相关测评后方可用于生产。

参考文献:

[1] 谭书明,蒲公英.刺梨复合饮料加工工艺研究[J].食品研究与开发,2000,(4):18-20.

[2] 中国科学院微生物研究所.常见与常用真菌[M].北京:科学出版社,1978.

[3] 李明霞,付秀辉.现代酵母分类鉴定方法与新技术[J].微生物学通报,1992,(2):117-121.

[4] 姜远良.化学分类法在细菌和真菌系统中的应用和发展[J].辽宁师范大学学报,1995,(2):152-155.

[5] 白逢颜.酿酒酵母属的分类研究进展[J].微生物学通报,2000,(2):139-142.

[6] 钱存柔.微生物学试验[M].北京:北京大学出版社,1987.

[7] 方善康.微生物试验技术[M].山东:山东大学出版社,1986.

[8] 沈萍,范秀容.微生物学试验[M].北京:高等教育出版社,2004.

[9] 张利平.链孢囊放线菌及其相关菌的数值分类研究[J].微生物学报,1996,(5):329-334.

[10] 甘肃农业大学.兽医微生物学试验指导[M].北京:农业出版社,1980.

[11] 诸葛健,等.工业微生物实验手册[M].北京:轻工业出版社,1994.

[12] 杜连祥,等.工业微生物学实验技术[M].天津:天津科学技术出版社,1992.

[13] 白逢颜,贾建华.克鲁斯假丝酵母及其近似种的脉冲电泳核型分析[J].微生物学报,1996,(5):329-334.

[14] 白逢颜,贾建华.脉冲电泳核型分析在酿酒酵母菌分类学研究中的应用[J].微生物学报,2000,(1):11-12.

[15] 赵金海.酿造工艺(下册)[M].北京:高等教育出版社,2002.

[16] 天津工业大学,大连轻工业学院,等.工业发酵分析[M].北京:中国轻工业出版社,2002.

[17] 穆问斌,余让扬,袁志强.酵母菌的分离及其特性的研究[J].酿酒,2004,(1):29-30.

[18] 王福源.现代食品发酵技术[M].北京:中国轻工业出版社,1998.

[19] 傅力.库尔勒香梨酵母 XL1 和 XL2 发酵性能的研究[J].食品科学,2003,24,(1):62.

[20] 牛天贵.食品卫生学实验技术[M].北京:中国农业大学出版社,2002.

.....

(上接第 19 页)

表3 正交实验结果

实验号	A 碳源(%)	B 氮源(%)	C pH	酶活(u/mL)
1	1	1	1	823.8
2	1	2	2	925.1
3	2	1	2	909.6
4	2	2	1	914.6
T ₁	1758.9	1733.4	1738.4	T=3574.1
T ₂	1824.2	1839.7	1835.7	
X ₁	879.45	866.7	869.2	
X ₂	912.1	919.85	917.85	
R	-32.65	-53.15	-48.65	

2.5 %的玉米粉、5 %的黄豆粉在 pH9.0 时的酶活最高。

3.5 正交实验结果验证

按正交实验所得的最佳发酵条件:2.5 %玉米粉,5 %黄豆粉,0.2 %NaCO₃,0.13 % K₂HPO₄·3H₂O,0.02 % MgSO₄·7H₂O,pH 为 9.0,以 2.2.1 叙述的发酵方法进行 5 个批次的发酵,测定发酵液酶活,以对正交实验结果进行验证,结果见表 4。

表4 正交实验验证结果

酶活	实验批次					平均数
	1	2	3	4	5	
酶活(u/mL)	891.4	937.1	882.9	874.3	878.6	892.86

4 结论

LZ10 是从土壤中分离的一株 β-CGTase 高产菌

株,有较好的酶学性质。本实验对该菌株的发酵培养基的碳源、氮源和 pH 3 个因素进行了优化,得到的碳源、氮源不仅能大幅度提高酶活单位,而且来源广泛,与可溶性淀粉、酵母膏、蛋白胨相比价格低廉,为进一步提高 β-CGTase 产生菌的发酵水平,使得酶活由优化前的 692.5 u/mL 提高到 892.86 u/mL,为 β-CGTase 应用于实际发酵生产奠定了基础。

参考文献:

[1] 宋国安.环状糊精的开发及应用 [J]. 适用技术市场,1999,(8):15-17.

[2] 田辉.环状糊精与环状糊精葡萄糖基转移酶 [J]. 工业微生物,1995,(2):33-37.

[3] 段书安.环状糊精的性质及其在食品工业中的应用 [J]. 中国乳品工业,1994,(5):32-34.

[4] [美] R.L.惠斯特勒.淀粉的化学与工艺学 [M]. 北京:中国食品出版社,1988.

[5] 王青.环状糊精的生产与应用 [J]. 食品研究与开发,1995,(3):27-30.

[6] 曹新志.环状糊精葡萄糖基转移酶产生菌株的快速筛选 [J]. 中国粮油学报,2003,(12):53-55.

[7] T.Shiraishi, S.Kusano, Y.Tsumuraya, and Y.sakano. [J]. Agric. Biol. Chem.1989,(53):2181.

[8] 张树政.酶制剂工业 [M]. 北京:科学出版社,1984.

[9] orikoshi K.U.S.Patent, 4, 135, 977, 1979.