

# 黄酒生产用酵母的分离与筛选

刘磊, 吴晖, 刘冬梅, 余以刚, 李晓凤

(华南理工大学轻工与食品学院, 广东 广州 510640)

**摘要:** 从 5 种不同的黄酒酒药中分离出了 10 株酵母菌, 并观察了它们的细胞形态和群体形态特征。通过对 10 株酵母比较发现, 1 号酵母和 8 号酵母在发酵能力、抗高温能力、耐乙醇能力及凝聚性等方面优于其它酵母, 从而筛选出两株性能优良的黄酒生产酵母菌株。

**关键词:** 酵母; 发酵; 分离; 筛选; 黄酒

**中图分类号:** TS261.1\*1; **文献标识码:** A; **文章篇号:** 1673-9078(2007)08-0005-04

## Separation and Screening of Yeasts for the Manufacture of Rice Wine

LIU Lei, WU Hui, LIU Dong-mei, YU Yi-gang, LI Xiao-feng

(College of Light Industry and Food Sciences, South China University of Technology, Guangzhou 510640, China)

**Abstract:** Ten yeasts were separated from five kinds of rice wine starters and their cell morphology and colony morphological characterization were analyzed. A comparison study of the achieved yeasts showed that the fermentation capacity, the resistant abilities of high temperature, ethanol and the cohesion performance of the two strains (No.1 yeast and No.8 yeast) were better than those of the others and were selected for producing the rice wine.

**Key words:** yeast; fermentation; separation; screening; rice wine

黄酒是世界三大古酒之一, 是中国历史最悠久的传统酿造酒。黄酒的酿造是一种受多种因素影响的微生物发酵过程, 曲是主要的糖化剂, 酵母是主要发酵剂<sup>[1]</sup>。在黄酒的生产中, 酵母菌能利用分解糖, 产生酒精, 其发酵性能的优劣直接影响到黄酒的品质和出酒率。本文从 5 种不同的黄酒酒药中分离出了 10 株酵母菌, 比较了它们的发酵力、抗高温能力、耐乙醇能力和凝聚性等特点, 筛选出了两株性能优良的黄酒生产菌株<sup>[2,3]</sup>。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料及试剂

酒药来自于江西、上海、梅州、湛江、柳州等产黄酒地; 麦芽汁培养基 (广东环凯微生物科技公司); 麦芽汁琼脂培养基 (广东环凯微生物科技公司); 分析纯乙醇 (天津市富宇精细化工有限公司); 色谱纯乙醇 (Sigma-Arich 公司)。

### 1.2 实验仪器

PQX-268 型多端可编程人工气候箱 (宁波东南仪器有限公司); 洁净工作台 (上海博迅实业有限公司)

收稿日期: 2007-07-16

基金项目: 国家自然科学基金项目 (20676042)

作者简介: 刘磊 (1982-), 男, 硕士研究生, 研究方向为食品微生物与安全

疗设备厂); 01J2003-04 型立式压力灭菌器筒 (上海博迅实业有限公司); 照相显微镜 (日本 OLYMUPUS)。

### 1.3 试验方法

#### 1.3.1 菌种的分离

将收集到的酒药样品分别称取 1 g, 放入已灭菌的三角瓶中, 加入适量无菌生理盐水, 放入少许玻璃珠, 在摇床上振摇 30 min, 吸取 1 mL 沿管壁注入含 9 mL 无菌生理盐水的试管中, 振摇试管混合均匀, 制成 1:10 的稀释液, 重复操作直到配成 1:10<sup>3</sup> 稀释液, 在无菌条件下每个稀释度都吸取 1 mL 到具有真菌选择性的麦芽汁平板上, 涂布均匀, 每个稀释度平行做两个样, 在 28 °C 条件下培养 2~3 d, 待形成单个菌落时挑取其中的单个菌落划线分离, 将纯菌种接入到试管斜面并于冰箱中低温 3~4 °C 保藏备用。

#### 1.3.2 酵母细胞的形态观察及大小测定

在载玻片中央加 1 滴 0.1% 吕氏碱性美蓝染色液, 挑取少量酵母菌菌落放在染色液中, 镜检并用镜台测微尺测定酵母菌的大小。

#### 1.3.3 酵母群体的形态观察

取分离所得的纯种菌株分别接种于麦芽汁平板培养基和麦芽汁液体培养基中, 28 °C 下培养 3 d 后观察其菌落形态和液体培养特征。

#### 1.3.4 酵母发酵力的比较

酵母筛选糖化醪的制作: 大米 200 g, 加水 800 g, 于电炉上加热至沸腾数分钟, 放入 60 °C 的恒温水浴锅内加入 1 mL 液化酶水解至用碘液检测不呈蓝色为止, 再加入糖化酶糖化 3 h 后灭菌待用。

将活化好的浓度相同的酵母菌液分别吸取 6 mL 接进装有 120 mL 的糖化醪三角瓶中, 称重记录原始重量, 而后放入 28 °C 的人工气候箱中发酵并于第 1 d、2 d、3 d、4 d、5 d、6 d、7 d 振荡并称重, 以了解发酵速度及失重情况, 待发酵终止时称重计算总失重, 并测定发酵醪中的残留的还原糖量、残留的总糖、总酸和酒精度。还原糖量、总糖、总酸的测定方法见参考文献<sup>[4]</sup>, 酒精度的测定按照 GB/T 15038-94。

### 1.3.5 酵母抗高温能力的比较

将经过初选的酵母接入糖化醪中分别在 36 °C、38 °C、40 °C、42 °C 条件下进行发酵, 7 d 后测发酵醪的酒精度。

### 1.3.6 酵母耐乙醇能力的比较

将经过初筛所选的酵母分别接入含酒精浓度 (按体积计) 8%、10%、12%、14%、16% 的糖化醪中, 于 28 °C 条件下发酵, 7 d 后测发酵醪的酒精度, 同时做空白对照, 二者的差值即为酵母发酵产生的酒精。

### 1.3.7 酵母凝聚性的比较

取 5 只试管接入麦芽汁液体培养基 10 mL, 然后接入酵母菌, 于 28 °C 培养 3 d 发酵结束, 大部分酵母沉至底部, 振荡摇匀, 测酵母数 (T), 静置 30 min, 测悬浮酵母数 (S), 凝聚酵母数  $F=T-S$ ,  $F'=F/S$ ,  $F'$  比值越大表示凝聚力越强<sup>[5-6]</sup>。

## 2 结果与分析

### 2.1 酵母的观察及鉴定

酵母的分离及形态观察见表 1, 共分离出 10 株酵母, 长度 2.66~9.92 μm, 宽度 2.92~6.47 μm, 芽殖是主要的繁殖方式, 大部分酵母无假菌丝。

表 1 酵母细胞形态及群体形态观察结果

菌株	菌种来源	细胞形态	有无假菌丝	繁殖方式	大小/μm	长轴/短轴	菌落形态	颜色	液体培养特征
1 号	湛江酒药	卵圆形	无	芽殖	9.92×4.94	1.87	凸起, 边缘整齐	浅黄色	形成沉淀、无菌膜, 液体澄清
2 号	梅州酒药	圆形	无	芽殖	3.01×2.94	1.02	平坦, 边缘整齐	乳白色	形成沉淀、有菌膜, 液体澄清
3 号	梅州酒药	椭圆形	无	芽殖	4.36×3.60	1.21	平坦, 边缘丝状	乳白色	形成沉淀、有菌膜, 液体澄清
4 号	湛江酒药	椭圆形	无	芽殖	8.34×6.47	1.29	凸起, 边缘整齐	白色	形成沉淀、有菌膜, 液体澄清
5 号	柳州酒药	圆形	无	芽殖	2.66×2.38	1.12	平坦, 边缘整齐	乳白色	形成沉淀、有菌膜, 液体澄清
6 号	上海酒药	球形	有	芽殖	4.62×4.09	1.13	平坦, 边缘丝状	白色	形成沉淀、有菌膜, 液体澄清
7 号	上海酒药	椭圆形	有	芽殖	9.32×3.71	2.51	平坦, 边缘整齐	乳白色	形成沉淀、有菌膜, 液体澄清
8 号	江西酒药	长卵形	无	芽殖	5.64×3.02	2.01	平坦, 边缘整齐	乳白色	形成沉淀、有菌膜, 液体澄清
9 号	江西酒药	椭圆形	有	芽殖	7.04×2.92	2.41	平坦, 边缘丝状	乳白色	形成沉淀、有菌膜, 液体澄清
10 号	柳州酒药	圆形	无	芽殖	6.12×5.98	1.13	凸起, 边缘整齐	红色	形成沉淀、无菌膜, 液体澄清

### 2.2 酵母发酵力

黄酒生产中, 酒精是酒药中的酵母利用发酵性糖而产生的, 因此把发酵糖产生酒精的能力作为衡量优良酵母的重要指标, 同时要求酵母具有较强的抵抗杂

菌的能力, 是为了防止黄酒在发酵的过程中容易变酸。从表 2 中成分分析可以看出 1 号、2 号和 8 号三株酵母产酒精能力较强, 均超过 7.3%, 而且发酵醪产生的总酸较低, 残余的还原糖和总糖也相对较少, 说明这

3 株酵母的发酵能力较强，而从表中可看出这三株酵母的发酵醪失重也相对较大。酵母进行无氧呼吸发酵产酒精时，产酒精越多，CO<sub>2</sub> 排出量也就越大，从而

失重也就越多。另将此次初筛选出的 5 株发酵力较强的酵母进行抗高温能力和耐乙醇能力的比较试验。

表 2 10 株酵母发酵醪失重及最后发酵醪成分分析结果

菌株	失重/g							总失重 /g	酒精度/(% 20 °C)	残还原糖 /(g/L)	残总糖 /(g/L)	总酸 /(g/L)
	1 d	2 d	3 d	4 d	5 d	6 d	7 d					
1 号	2.7	3.4	1.8	1.9	0.5	0.3	0.2	10.8	7.91	3.92	6.66	1.01
2 号	2.5	2.7	1.1	1.1	0.3	0.2	0.2	8.1	7.52	4.15	6.82	1.16
3 号	0.8	1.2	1.4	1.2	0.5	0.5	0.4	6.0	4.83	7.30	10.93	2.31
4 号	1.1	2.3	1.4	1.0	0.5	0.2	0.3	6.8	6.52	6.30	9.32	2.92
5 号	0.6	1.6	1.9	1.8	1.3	0.3	0.1	7.6	7.02	5.05	8.34	1.24
6 号	1.0	1.7	2.6	0.6	0.4	0.4	0.3	7.0	6.80	5.51	9.03	2.68
7 号	0.6	1.0	1.0	0.9	0.6	0.8	0.1	5.0	3.92	8.30	15.01	1.71
8 号	1.6	1.9	0.8	0.7	0.9	1.6	0.3	7.8	7.31	4.52	7.03	1.82
9 号	0.3	0.4	2.4	1.7	1.1	0.7	0.3	6.9	6.81	5.23	9.26	2.26
10 号	0.7	0.9	1.0	1.1	1.1	0.8	0.2	5.8	4.01	8.16	13.60	1.52

### 2.3 酵母抗高温能力

在酿造黄酒的过程中，淀粉糖化和酒精发酵两个作用是同时进行的，原料中的各种糖化菌的呼吸作用和酵母的发酵作用放出了大量的热，另外，黄酒醪的浓度高，发热量大，同时原料大米是整粒的，发酵时易浮在上面形成被盖，导致热量的散失差，使得在主发酵过程中温度有时会高达 40 °C 左右，因此要求生产中的酵母菌具有较强的耐热能力，并能高温下保持较高的发酵能力<sup>[7-8]</sup>。从图 1 可知，5 株酵母在高温条件下均能进行一定程度的发酵，比较五株酵母在不同温度下的产酒精能力可以发现，1 号酵母和 8 号酵母在不同温度下的发酵性能比其它酵母更稳定，它们在温度高达 42 °C 时仍可进行发酵，产酒精在 3.00% 以上。其它三株酵母随着温度的升高发酵能力下降的幅度较大，性能不稳定。

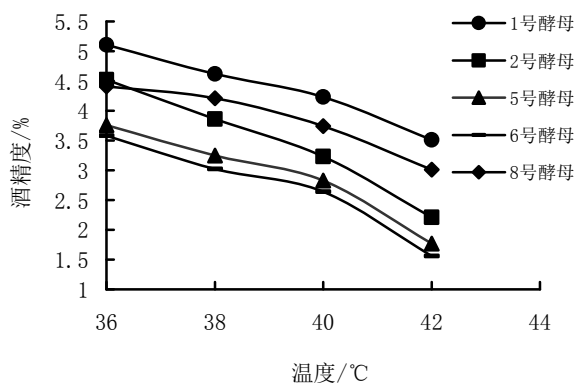


图 1 抗高温能力比较

### 2.4 酵母耐乙醇能力

黄酒醪在主发酵期间酒精含量可达 12%~14%，

经过低温长时间的后发酵，酒精含量最高能达到 20% 以上，在世界酿造酒中是最高的<sup>[8]</sup>，然而酒精能破坏酵母体内的蛋白质，从而杀死酵母，因此要求生产中的酵母要具备一定的耐受酒精的能力，从图 2 可以看出 2 号酵母、5 号酵母、6 号酵母在不同酒精浓度的发酵醪中产酒精的能力都很低，很难进行发酵，耐乙醇能力低，1 号酵母和 8 号酵母的耐乙醇能力比 2 号酵母、5 号酵母、6 号酵母强，能进行一定的发酵，在乙醇浓度达到 10% 时产酒精分别达到 3.01%、2.61%，但当酒精浓度超过 12% 时，发酵比较微弱。

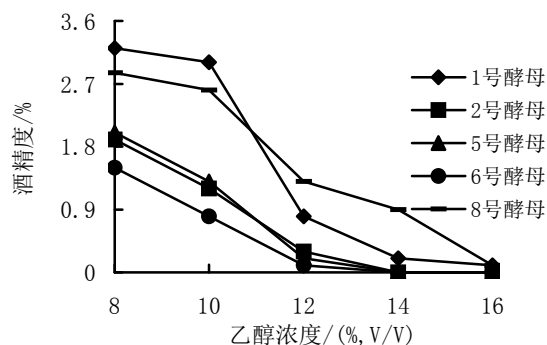


图 2 耐乙醇能力比较

### 2.5 酵母的凝聚性

由表 3 可知 5 株酵母的凝聚性的大小为（从大到小排列）：1 号酵母、8 号酵母、2 号酵母、5 号酵母、6 号酵母。在发酵工业中，酵母细胞的凝聚性是评价菌种优劣的一个重要指标。若细胞凝聚性强，分散于发酵液中的细胞相互聚集形成絮凝颗粒并沉降，从而有利于细胞同发酵液的有效分离，可大大简化后处理工艺。若酵母凝聚性弱，会给过滤带来困难，而且会

对产品口味产生影响<sup>[9]</sup>。

表 3 酵母凝聚性的测定结果

菌株	1号	2号	5号	6号	8号
F	0.65	0.58	0.54	0.45	0.62

## 2.6 两株酵母细胞形态观察

在显微镜(10×40)下观察1号酵母和8号酵母的细胞形态如图3和图4所示,1号酵母呈卵圆形,个体较大,8号酵母呈长卵形,个体较小,两株酵母都没有假菌丝,繁殖方式都以两端芽殖为主。

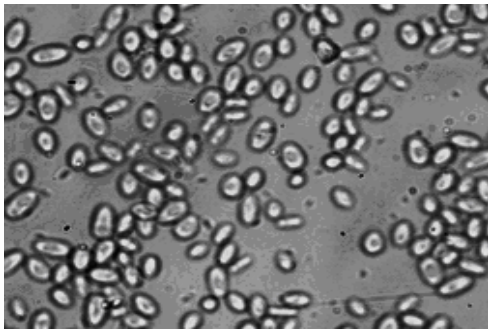


图 3 1号酵母的细胞形态

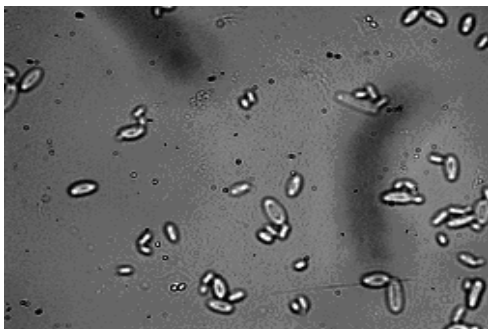


图 4 8号酵母的细胞形态

## 3 结论

从5种酒药中分离出10株酵母菌。通过对10株酵母在28℃下的发酵力比较发现1号酵母、2号酵母、

8号酵母的发酵力较强,酒精度都在7.30%以上。

通过对5株发酵力较强的酵母进行抗高温能力的比较发现,1号酵母和8号酵母的抗高温能力强、发酵能力稳定,它们在温度高达42℃时仍可进行发酵,产酒精在3.00%以上。

通过对5株发酵力较强的酵母进行耐乙醇能力的比较发现,从湛江酒药中分离出的1号酵母和从江西酒药中分离出的8号酵母的耐乙醇能力较强,在较高乙醇浓度下能进行发酵;在凝聚性的比较中,1号酵母和8号酵母的凝聚性比另三株要强。此两株菌株具备较强的发酵力、抗高温能力、耐乙醇能力及凝聚性等特点,符合酿制优质黄酒对优良酵母菌种的要求,可以用到黄酒的生产中,以提高黄酒的产量和质量。

## 参考文献

- [1] 傅金泉.中国黄酒的起源[J].酿酒科技,1992(4):58
- [2] 单斌,赵鹏,董建军,等.几种不同大小啤酒酵母菌株的性能比较[J].啤酒科技,2004(1):24-25
- [3] 温海祥.黄酒生产中酵母菌发酵性能研究[J].食品与发酵工业,2007,33(1):72-74
- [4] 张水华.食品分析[M].北京:中国轻工业出版社,2004
- [5] 张纪忠.微生物分类学(第一版)[M].上海:复旦大学出版社,1989
- [6] 杜连祥.工业微生物实验技术[M].天津:天津科学技术出版社,1992
- [7] 董永胜,张德中,王立言,等.固态发酵耐高温酒精酵母的选育及生产应用[J].酿酒,2005(4):59-60
- [8] 李平兰,王成涛.发酵食品安全生产与品质控制(第一版)[M].化学工业出版社,2005
- [9] 曹晓霞,金玉来.外部因素对酵母凝聚性影响的初步探讨[J].江苏农业研究,2000,21(1):60-63

## 凉菜忌与白酒同食

古时曾有“饮白酒,食生韭令人增病”的说法,而在《饮膳正要》中也有“韭不可与酒同食”之类的记载,其道理大致也与食物药性有关。

白酒甘辛微苦,性大热,含乙醇约60%左右,1g乙醇在体内燃烧,产热7100卡,乙醇在肝内代谢,嗜酒者可引起酒精中毒性肝炎、脂肪肝及肝硬化。酒性辛热,有刺激性,能扩张血管,使血流加快,又可引起胃炎和胃肠道溃疡复发。韭菜性亦属辛温,能壮阳活血,食生韭饮白酒,就像火上加油,久食动血,有出血性疾病的患者更要加倍注意。