

酒曲中生香酵母的分离鉴定与产酯工艺优化

周世水, 熊建春

(华南理工大学生物科学与工程学院, 广东广州 510640)

摘要: 用添加 30 U/mL 硫酸链霉素抑制霉菌方法从酒曲中富集和筛选出具有典型酵母菌落特征的菌株, 通过鉴定实验确定为生香酵母。选取其中 10 株进行发酵, 比较它们发酵酒的酒精度、总酸和总酯, 筛选出酒精度和总酯含量最高的菌株是 Y2-7。通过发酵条件优化和小试, 得到蒸馏酒 60% (v/v) 中总酯含量达 2.1 g/L, 酒液酯香明显。

关键词: 生香酵母; 分离鉴定; 总酯; 工艺优化

文章编号: 1673-9078(2010)1-98-3

Isolation and Identification of Ester-producing Yeast in Wine Starter and its Application in Ester production

ZHOU Shi-shui, XIONG Jian-chun

(School of Bioscience and Bioengineering, South China University of Technology, Guangdong 510640, China)

Abstract: Yeasts were concentrated and screened from wine starter of liquor by adding 300U/mL streptomycin sulphate which repressed the growth of molds. These yeasts showed ester-producing capabilities, among which 10 stains were chose. And the alcohol degree and total ester content in the fermentations by the 10 strains were compared. Results showed that the highest alcohol degree and total ester content was achieved in the optimized fermentation by Y2-7, which were 60% (v/v) and 2.1 g/L, respectively.

Key words: ester-producing yeast; isolation and identification; total ester; process optimization

生香酵母又称为产酯酵母, 主要属于产膜酵母和假丝酵母, 其中大多数是异型汉逊酵母及少数小圆型酵母属, 它是中国白酒中酯香的主要产生菌^[1]。生香酵母能够以乙醇为碳源, 即具备酒精发酵能力又具备醋酸发酵能力, 能产生以酯香为主的多种香味物质。目前生香酵母已在白酒、葡萄酒、食醋、香精、香料等发酵行业得到应用。因此, 从中国浓香型酒曲、酱香型酒曲中分离出生香酵母, 并进一步提升生香酵母的产酯能力和优化各种酯的组成比例, 酿造出酯香更浓香的美酒, 这符合国内广大消费者的嗜好和需求, 对提高国产酒的品质非常有意义。

1 材料与仪器

1.1 菌种

白酒酒曲, 华南理工大学实验室提供。

1.2 培养基

1.2.1 富集培养基

麦芽汁液体培养基, 灭菌后加入 300 U/mL 硫酸

链霉素。

1.2.2 马丁-孟加拉红初筛培养基

葡萄糖 10.0 g/L、蛋白胨 5.0 g/L、磷酸氢二钾 1.0 g/L、7 水合硫酸镁 0.5 g/L、孟加拉红 3.3 mg/L、琼脂 2 g/L、300 U/mL 硫酸链霉素。

1.2.3 发酵产酯培养基

配制 50 g/L 麦芽汁浓度的甘蔗汁发酵液, 糖度 17%。

1.3 仪器

糖度折光仪、分光光度计、OLYMPUS 光学显微镜等。

1.4 方法

1.4.1 富集培养^[2]

取少量酒曲加入到 10 mL 麦芽汁培养液试管中, 28 °C 摇床培养 24 h, 培养过程中若出现菌丝体应立即挑出。再取 1 mL 接种到另一支试管中培养。经过 3~4 次的转接培养即可。

1.4.2 酵母菌的分离筛选^[2]

取富集培养酵母液, 按 10 倍梯度稀释到 10^{-7} , 取稀释度为 10^{-5} 、 10^{-6} 、 10^{-7} 各 0.1 mL 的溶液, 分别涂布于马丁-孟加拉红培养平板, 28 °C 培养 48 h。

收稿日期: 2009-07-03

基金项目: 华南理工大学实验教研项目 (G02-Y1090240)

作者简介: 周世水, 男, 副教授, 研究方向发酵工程、酿酒

1.4.3 酵母菌的筛选^[2]

对平板上长出的典型酵母单菌落，经美蓝染色后制片镜检，记录酵母的菌落形态和细胞形态，挑取典型酵母菌落到麦芽汁斜面，28℃培养48h备用。

1.4.4 酵母菌的鉴定^[3]

1.4.4.1 形态学鉴定

培养酵母菌株进行巨大菌落观察^[4]、子囊孢子观察^[5]、细胞形态学观察和假菌丝观察^[6]。

1.4.4.2 生理学初步鉴定

(1) 糖发酵试验^[2]：酵母先在25℃下用氮源基础培养基饥饿培养3d，制备碳源饥饿酵母，按2.5%接种到12.5%豆芽汁中（加20g/L葡萄糖），28℃发酵2周，每天观察产气情况。

(2) 硝酸盐利用试验^[7]：酵母先在25℃下用碳源基础培养液培养5~7d，制备氮源饥饿酵母，取1mL与灭菌后45℃的碳源基础培养基（含20g/L琼脂粉）混合制成平板，点少量硝酸盐在平板上，25℃培养2~3d，所点试剂处或周围有酵母菌落生长，即为阳性反应。

(3) 产类淀粉化合物测定试验^[7]：将酵母接种于蛋白胨酵母膏葡萄糖（PYD）培养液中，28℃培养后加入1滴Lugol's碘液，呈蓝色、紫色或绿色反应为阳性，表示生成了类淀粉化合物。

(4) 脲酶实验^[7]：在水解尿素试验的琼脂斜面上，28℃培养酵母5~7d，呈淡红色，表明能分解尿素。

1.4.5 生香酵母发酵筛选试验

取鉴定的生香酵母10株，28℃下用麦芽汁培养7d。测定发酵液的酒精度、总酯^[8]，筛选高产酯菌株。

2 结果与讨论

2.1 分离结果

经过多次分离纯化，镜检确定酒曲中含有3类酵母菌，记为Y1、Y2、Y3。

2.2 菌落形态鉴定

培养并记录三类酵母菌Y1、Y2、Y3的菌落形态、繁殖方式，结果如表1。

2.3 酵母菌属的鉴定

按酵母分类学鉴定方法^[9]，对三类酵母菌Y1、Y2、Y3酵母初步生理生化实验鉴定，结果如表2。

表1 菌落形态学鉴定结果

菌株	颜色	形状	透明度	光滑度	边缘	细胞形态	菌丝
Y1	乳白	圆	透明	光滑	整齐	椭圆、棒状	有
Y2	白乳	圆	透明	光滑	整齐	椭圆、卵圆	无
Y3	乳白	圆	不透明	光滑	整齐	小椭圆	无

表2 酵母繁殖方式及生化鉴定结果

Table 2 Identification of biochemical properties and reproductive system of the yeasts

菌株	无性繁殖	子囊孢子	硝酸盐利用	产类淀粉物质	葡萄糖发酵	脲酶试验
Y1	多端芽殖	1~4个月牙形	-	-	+	-
Y2	多端芽殖	1~4个帽形	+	-	+	-
Y3	多端芽殖	无	-	-	+	-

注：+为阳性；-为阴性。

由表1、表2可知，菌株Y1的细胞为椭圆形、多边芽殖、有菌丝形成、有1~4个月牙形子囊孢子、葡萄糖发酵阳性、硝酸盐还原、脲酶实验和类淀粉物质实验为阴性、形态学和生化特性，按J·Lodder(1970)分析确定为德克酵母属。对菌株Y2、Y3的鉴定结果分析确定为汉逊酵母属、酒香酵母属。

2.4 生香酵母发酵筛选

菌株Y2为汉逊酵母属，属典型生香酵母。选取Y2培养平板上的10株进行发酵，筛选出总酯含量最高达1.0g/L的菌株Y2-7作为初始菌株，进一步做产酯工艺优化的研究。

2.5 菌株Y2-7发酵产酯的工艺优化

选择3因素3水平的L₉(3³)正交实验优化Y2-7发酵产酯条件，因素水平和结果如表3。

表3 Y2-7发酵产酯的正交实验结果

Table 3 Factors & levels and results of the orthogonal experiment of total ester produced by Y2-7

试验号	A(温度/℃)	B(时间/d)	C[(甘蔗汁中麦芽汁浓度/(g/L))]	总酯浓度(g/L)
1	20	5	50	0.36
2	20	6	100	0.65
3	20	7	200	0.51
4	24	5	200	1.05
5	24	6	50	1.16
6	24	7	100	2.14
7	28	5	100	1.27
8	28	6	200	1.07
9	28	7	50	1.32
K1	1.52	2.68	2.84	
K2	4.35	2.88	4.06	
K3	3.66	3.97	2.63	
R	2.83	1.29	1.43	

注：总酯含量是以60% vol酒精度时的酯含量折算。

从表3可知，温度对发酵产酯的影响最显著，其

(下转第108页)