

孝感凤窝酒曲中酵母菌的分离及特性研究

王小红, 徐康, 赵山, 陈福生, 张秀艳

(华中农业大学食品科技学院, 湖北 武汉 430070)

摘要:采用 PDA 培养基和麦芽汁固体培养基对孝感凤窝酒曲中的酵母菌进行分离, 得到 16 株酵母菌。经显微形态观察和 API 20C AUX 菌种鉴定系统鉴定, 将得到的酵母菌归属, 其中 9 株属于酿酒酵母菌属, 另外 7 株为假丝酵母菌属, 并对其发酵特性进行了初步的研究。

关键词:孝感凤窝酒曲; 酵母菌; 分离; 特性

中图分类号: TS261.1; **文献标识码:** A; **文章编号:** 1673-9078(2008)02-0134-04

Isolation and Characteristics of Yeasts from Xiaogan Fengwo Rice Wine Starter

WANG Xiao-hong, XU Kang, ZHAO San, CHENFu-sheng, ZHANG Xiu-yan

(Department of Food Science and Technology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China)

Abstract: In this paper, 16 yeast strains were isolated from Fengwo rice starter and purified by PDA and malty solid mediums. Morphological observation and identification with the API 20C AUX system showed that, among the 16 yeast strains, 9 strains were of *Saccharomyces cerevisiae* and 7 strains were of *Candida*. The fermentability of these yeasts was also studied.

Key words: Xiaogan Fengwo rice starter; yeasts; isolation; characteristics

甜酒在我国有悠久的饮用历史。孝感米酒属于甜酒, 以优质糯米为原料, 用孝感产的酒曲—凤窝酒曲作发酵剂, 经糖化发酵制成。凤窝酒曲是在特定的生态环境内, 用成曲作为母种培养生产的。甜酒曲是决定甜酒产品质量的关键, 目前市售的甜酒曲大多含有多种微生物, 有根霉、毛霉、犁头霉和酵母菌等。由于采用自然培养的方法制曲, 菌种质量不易稳定, 易带进有害杂菌, 使酒酿酸苦, 酒曲糖化和发酵力低, 发酵时间长, 生产受到季节影响, 不能适应大罐发酵高速度的要求。

本实验对孝感凤窝酒曲中的酵母菌进行分离纯化及发酵特性的研究, 旨在研究其微生物种类, 为酒曲优势菌群的构建, 降低生产成本, 提高出酒率, 给发酵生产提供直接或间接的依据, 也可开发更有价值的甜酒菌株提供一些实验依据。

1 材料与方法

1.1 主要试剂和仪器

收稿日期: 2007-10-12

项目基金: 湖北省科技厅资助项目 (2007AA204A03)

作者简介: 王小红 (1970-), 女, 副教授 (博士), 研究方向: 食品微生物与食品安全

凤窝酒曲: 湖北孝感麻糖米酒有限责任公司提供。大麦芽、红糖、玉米粉均为市售产品。染色液: 5%孔雀绿水溶液、0.5%番红染色液。其它药品与试剂均为生化试剂或分析纯试剂。

API 20C AUX 菌种鉴定系统, 法国生物梅里埃公司; HPS-250 型生化培养箱, 哈尔滨东联电子技术开发有限公司; DME LEICA 显微镜, 上海莱卡显微系统有限公司; VD-1320 型洁净工作台, 哈尔滨东联公司。

1.2 主要培养基

1.2.1 酵母菌分离培养用培养基

PDA 培养基、麦芽汁液体培养基、麦芽汁琼脂培养基, 参见文献^[1]。

红糖发酵培养基^[2]: 10%红糖, 0.2%硫酸铵, 0.1%磷酸二氢钾, pH 5.5, 0.07 MPa 灭菌 30 min。

1.2.2 酵母菌鉴定培养用培养基

(1) 玉米粉琼脂培养基^[3]: 向 60 g 玉米粉中先加入少量水调成糊状, 再逐渐加水至 1000 mL, 搅匀后置于 80~90 °C 的水浴里保持 1.5 h 后过滤 (中间搅拌 3~4 次), 滤液补加水至 1000 mL, 加琼脂 15 g, 加热融化后趁热用脱脂棉过滤, 分装到试管和三角瓶内, 0.07 MPa 灭菌 30 min。

(2) 麦氏培养基(醋酸钠琼脂培养基): 0.1%葡萄糖, 0.18%氯化钾, 0.25%酵母膏, 0.82%醋酸钠, 2%琼脂, 以自来水配制, 装于 18×180 mm 试管中, 每管 8 mL, 0.07 MPa 灭菌 30 min。

1.3 实验方法

1.3.1 酵母菌的分离与纯化

无菌条件下, 将凤窝酒曲粉碎, 称取适量样品, 稀释后选取适宜的稀释度, 用倾注平板法, 分别用 PDA 琼脂培养基和麦芽汁琼脂培养基在 28 °C 培养 36 h 后, 观察菌落形态, 选定可疑菌落反复进行平板划线分离和镜检, 分离纯化酵母菌。确认酵母菌接种到 PDA 斜面培养基上, 28 °C 培养 36 h 后, 置于 4 °C 保存备用^[4]。

1.3.2 酵母菌的鉴定

1.3.2.1 菌落特性的观察

将被检菌用稀释平板法在麦芽汁琼脂培养基上 28 °C 培养 36 h, 选取单个菌落观察其颜色、形状、透明度、光滑、湿润和边缘整齐等特征。

1.3.2.2 细胞形态的观察

将待检菌接种到 PDA 斜面培养基上, 28 °C 培养 24 h。显微镜观察细胞形态。

1.3.2.3 假菌丝的形成^[2]

用玉米粉琼脂平板法观察假菌丝的有无及形态。

1.3.2.4 子囊孢子的观察^[2]

将待检菌接种于麦氏培养基(醋酸钠琼脂培养基)斜面上, 28 °C 培养 7 d 后, 染色观察。

1.3.2.5 掷孢子的形成

将 10~15 mL 的玉米粉琼脂培养基倒入一个培养皿中, 当琼脂凝固时, 将旺盛生长的被检酵母菌在培养基上沿着 2 个垂直直径划线接种, 把接种后的培养基倒置放入另一个培养基中, 底层的培养皿中也倒入玉米粉琼脂培养基, 28 °C 培养箱中保温培养 3 周左右, 若能射出掷孢子可在对面培养皿盖上形成与菌落相同的镜像, 说明该酵母菌可产生掷孢子, 进一步观察掷孢子的形状和大小^[5]。

1.3.2.6 酵母菌生理生化鉴定

使用 API 20C AUX 酵母菌鉴定系统, 选用葡萄糖苷、甘油、2-酮基-葡萄糖酸盐等 19 种不同碳水化合物为底物进行测定, 观察酵母菌对碳水化合物的利用。酵母菌的鉴定使用 API Lab Plus V3.0 Version (bioMérieux, France) 菌种鉴定系统, 酿酒酵母菌 (*Saccharomyces cerevisiae*) CGMCC 2.604 作为模式菌株^[6]。

1.3.3 酵母菌发酵特性的研究

1.3.3.1 酵母菌产气、发酵气味和凝聚性的研究

无菌条件下, 将待检菌种接种于 10 mL、13 °BX、自然酸度的含有杜氏发酵管的灭菌麦芽汁试管中(接种量 1×10^7 个/mL), 观察酵母菌株产气、发酵气味及凝聚性方面的性能。每个菌株做 2 次重复。

1.3.3.2 酵母菌发酵力的研究

无菌条件下, 将在 PDA 斜面培养基上保存的酵母菌, 接种于 10 mL、8 °BX 的灭菌麦芽汁试管中, 置于 28 °C 培养 24 h, 活化 2 次。将活化后的麦芽汁液体试管菌种按约 2% 的接种量接入装有 50 mL 红糖发酵液的小三角瓶中, 置于 28 °C 培养 24 h。将上述液体菌种按 5% 的接种量接入 250 mL 三角瓶的红糖发酵液中, 置于 28 °C 培养 7 d, 观察和测定二氧化碳的产量、发酵力和酒精度的大小^[7]。

2 结果与分析

2.1 酵母菌的分离与纯化

在 PDA 琼脂平板和麦芽汁琼脂平板上经过多次划线分离后, 从孝感凤窝酒曲中共分离出 16 株酵母菌(菌落编号为 1[#]~16[#])。

2.2 酵母菌的鉴定

2.2.1 酵母菌菌落形态和显微形态观察

分离得到的 16 株酵母菌经菌落形态和细胞形态观察, 可将其分为 I (菌落编号 1[#]~9[#]) 和 II (菌落编号 10[#]~16[#]) 二类, I 类酵母菌在麦芽汁琼脂培养基上生长的菌落为乳白色、圆形、中央凸起、边缘整齐、表面湿润光滑、有光泽、不透明、粘稠、易挑起, 打开平板可闻到较强的酒香味, 典型菌落形态如图 1A 所示。II 类酵母菌在麦芽汁琼脂培养基上生长的菌落为淡黄色、圆形、中央凸起、边缘整齐、表面湿润稍有皱折、不透明, 打开平板可闻到很强的酱香味, 典型菌落形态如图 1B 所示。

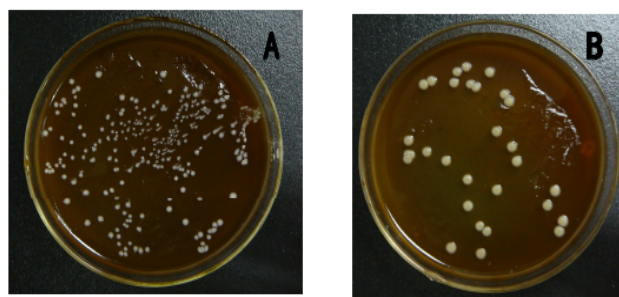


图 1 酵母菌在麦芽汁琼脂平板上的菌落形态

A: I 类酵母菌 B: II 类酵母菌

Fig.1 The colony morphology of yeasts on wort agar culture

I 类酵母菌在显微镜下观察, 细胞大小均匀, 呈

圆形或者卵圆形，无性生殖为多边芽殖，有性生殖会产生 1~4 个子囊孢子如图 2A 和 2B 所示。此类酵母菌在玉米粉琼脂培养基中没有假菌丝形成，在倒置的玉米粉琼脂培养基上生长时无掷孢子生成。

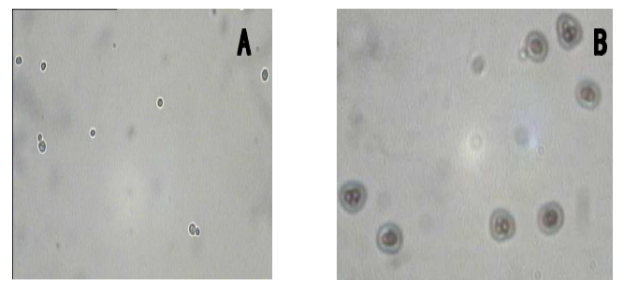


图 2 I 类酵母菌的显微形态图
图 A: 细胞形态、出芽生殖(×400)；图 B: 子囊孢子(×1000)
Fig.2 Morphological micrograph of type I yeast

II 类酵母菌在显微镜下观察，细胞大小比较均匀，呈圆形，无性生殖为芽殖，没有有性生殖，即不产生子囊孢子如图 3A 所示。在麦芽汁液体培养基中培养 24 h 后，在显微镜下能够看到比较发达的菌丝如图 3B 所示。此菌在玉米粉琼脂培养基中有假菌丝形成，在

倒置的玉米粉琼脂培养基上生长时无掷孢子生成。

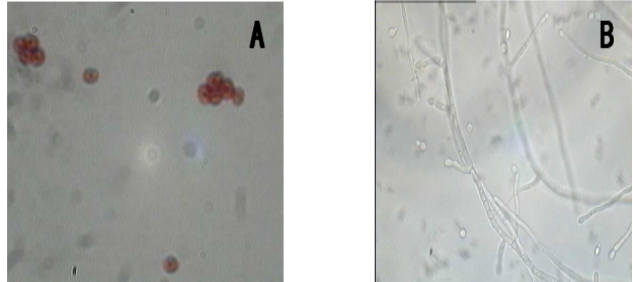


图 3 II 类酵母菌的显微形态图
图 A: 细胞形态(×1000)；图 B: 假菌丝(×400)
Fig.3 Morphological micrograph of type II yeast

2.2.2 酵母菌的糖同化结果
分离得到的酵母菌，经过 API 20C AUX 酵母菌鉴定系统测得这些酵母菌的糖同化反应结果见表 1。模式菌酿酒酵母菌能利用棉子糖，而 I 类酵母菌也能够利用棉子糖，其同化反应结果与模式菌相同；而 II 类酵母菌不能够利用棉子糖，仅能利用葡萄糖苷、麦芽糖和己糖。故确定 I 类酵母菌为酿酒酵母菌，II 类酵母菌为假丝酵母属。

表 1 分离得到酵母菌的生化特性

Table 1 Biochemical properties of isolated yeasts					
测定指标	I 类酵母菌	II 类酵母菌	测定指标	I 类酵母菌	II 类酵母菌
空白	-	-	山梨醇 (SOR)	-	-
葡萄糖苷(GLU)	+	+	MDG	-	-
甘油 (GLY)	-	-	NAG	-	-
2-KG	-	-	纤维二糖 (CEL)	-	-
L-阿拉伯糖 (ARA)	-	-	乳糖 (LAC)	-	-
D-木糖 (XLT)	-	-	麦芽糖 (MAL)	+	+
阿东醇 (ADO)	-	-	己糖 (SAC)	+	+
木糖醇 (XLT)	-	-	海藻糖 (TRE)	-	-
GAL(GLYcerol)	-	-	松叁糖 (MLZ)	-	-
肌醇 (INO)	-	-	棉子糖(RAF)	+*	-
HYPHE	-	+			

注：“+”为反应阳性，“-”为反应阴性；“*”为模式菌反应结果；“2-KG”为 2-酮基-葡萄糖酸盐，“MDG”为 a-甲基-D-葡萄糖，“NAG”为 N-乙酰-葡萄糖苷。

根据《酵母菌特性及鉴定手册》和《真菌鉴定手册》等介绍的方法^[8]，酵母菌的鉴定主要以形态学特征为主，并结合生理学特征。形态观察包括细胞形态、子囊孢子的形成及其形态、假菌丝的形成、掷孢子的形成和培养特性。生理生化试验包括同化碳源、同化硝酸钾、发酵糖类、产淀粉类物质等。本实验应用 API 20C AUX 系统鉴定酵母菌，具有快速、准确的特点。

2.3 酵母菌发酵特性的研究

2.3.1 酵母菌产气、发酵气味和凝聚性的研究

对实验分离出来的 16 株酵母菌菌株分别接种于 10 mL、13 °BX 灭过菌、含有杜氏小管的麦芽汁试管中，进行产气、发酵气味及凝聚性的初步试验。其试验结果如表 2 所示。

由表 2 可知，1[#]~10[#]酵母菌在含有杜氏小管的试管中，置于 28 °C 培养 48 h，其产生的气体能充满杜氏小管，说明这些酵母菌起酵能力比较强，并且可能有较高的发酵度和发酵效率。而 11[#]~16[#]酵母菌的起酵能力比较弱。这些菌株的发酵液都能嗅到较纯的酒香

味,说明这些菌株可能有较强的产香能力,同时凝聚性良好。

表2 酵母菌产气、发酵气味和凝聚性的研究

Table 2 The agglomeration and fermentation odor and aerogenesis of yeasts

菌株编号	发酵气体充满杜氏管的时间/h	发酵气味	凝聚性
1	48	正常	良好
2	48	正常	良好
3	48	正常	良好
4	48	正常	良好
5	48	正常	良好
6	48	正常	良好
7	48	正常	良好
8	48	正常	良好
9	48	正常	良好
10	48	正常	良好
11	72	正常	良好
12	72	正常	良好
13	72	正常	良好
14	72	正常	良好
15	72	正常	良好
16	72	正常	良好

2.3.2 酵母菌发酵力的研究

表3 酵母菌的发酵力试验

Table 3 Fermentation ability of yeasts

菌株编号	二氧化碳含量/g	酒精度/%	外观发酵度/%
1	5.46	6.4	70.27
2	5.18	5.6	69.73
3	5.42	6.3	75.14
4	5.09	6.4	76.22
5	6.09	6.3	76.75
6	6.91	6.4	76.75
7	7.08	6.5	78.38
8	7.11	6.6	78.38
9	6.40	6.3	70.81
10	5.93	6.1	70.81
11	5.64	6.0	69.73
12	5.60	6.0	69.73
13	5.88	6.3	75.14
14	6.15	6.5	69.73
15	6.12	6.5	72.97
16	6.60	6.2	69.73

酵母菌的发酵力反映酵母对各种糖类的发酵情

况,一般包括二氧化碳失重的测定、发酵度和酒精度的测定。酵母菌的酶系不同,发酵糖类的能力也不同,发酵过程中除产生乙醇外,还伴有二氧化碳形成,形成的二氧化碳从发酵液中逸出,使整个体系的重量减轻,根据减轻的程度,可以测定发酵速率的快慢。发酵度测定是基于酵母菌降糖的能力,即发酵前后发酵液中糖分减少的幅度。酒精度的测定通常采用蒸馏法。本实验将分离得到的16株酵母菌分别进行产酒精度、二氧化碳和发酵力的实验,结果如表3所示。

由表3可知,这16株菌产生的酒精度相差不是很明显,而二氧化碳产量不同,其中7[#]和8[#]菌的二氧化碳产量超过7g,外观发酵度相同,均为78.38%。酒类酿造是在酵母属酵母,如酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)的作用下,在厌氧条件下将糖类转化为乙醇和二氧化碳,同时,产生其它一些影响口感、风味的次级产物。根据2.2酵母菌鉴定的结果可知,7[#]和8[#]酵母菌均为酿酒酵母,这两株酵母菌是否是凤窝酒曲中的优势酵母菌有待进一步研究。

3 结论

从孝感凤窝酒曲中分离筛选出16株酵母菌,经形态学、生理学鉴定,16株酵母菌中有9株属于酿酒酵母属,7株属于假丝酵母菌属。这些酵母菌产酒精的能力相近,其中7[#]和8[#]酵母菌发酵力较强,有待进一步研究其发酵特性。

参考文献

[1] 赵斌,何绍江.微生物学实验[M].北京:科学出版社,2002, 251-253

[2] 刘慧主编.现代食品微生物学实验技术[M].北京:中国轻工业出版社,2006,231-235

[3] 郝林主编.食品微生物学实验技术[M].北京:中国农业出版社,2001,56-57

[4] 周德庆主编.微生物学实验手册[M].上海:上海科学技术出版社,1994,197-227

[5] 张积荣,姚新奎,谭晓海.酸马奶中酵母菌的分离提纯及鉴定[J].新疆农业科学,2007,(2):206-211

[6] 王丽敏,李军,胡小松.苹果原料中酵母菌的分离鉴定[J].中国农业大学学报,2004,(4):14-17

[7] 李阜棣,喻子牛,何绍江.农业微生物学实验技术[M].北京:中国农业出版社,1996,223-225

[8] 巴尼特 J A 著.酵母菌特性及鉴定手册[M].胡瑞卿译.青岛:青岛海洋大学出版社,1991,144-171