

优良黄酒酵母的筛选及其抗逆性能分析

杨昶津^{1,2}, 俞剑燊^{2,3}, 夏永军^{1,2}, 方逸群³, 倪斌³, 王光强², 艾连中^{1,2}

(1. 上海理工大学医疗器械与食品学院, 上海 200093) (2. 上海黄酒工程技术研究中心, 上海 200093)

(3. 上海金枫酒业股份有限公司, 上海 200120)

摘要: 从上海地区黄酒酿造企业的主发酵液、酒母和酒糟中分离得到 4 株起酵能力、产酒精能力和发酵性能较好的 BR 20、BR 25、BR 26 和 BR 30 菌株。经 5.8S rDNA-ITS 测序分析, 鉴定分离筛选所得的 4 株菌为酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)。分析研究 4 株菌对高浓度乙醇、高糖浓度、高浓度乳酸和高渗透压的耐受性, BR 20 和 BR 30 菌株可耐受 18% 的酒精, 对 1.6 mol/L 高渗透压有较好的适应性; BR 20 与 BR 26 菌株在高达 54 g/L 的乳酸下具有较好的生长; BR 30 菌株对 40% 糖浓度表现出最强的耐受能力; 最终筛选出抗逆性能较强的 BR 20 和 BR 30 菌株。比较研究了 BR 20 菌株和 BR 30 菌株的发酵效率, BR 20 菌株的底物利用率较 BR 30 菌株平均高出 1.67%, BR 20 菌株的乙醇产率较 BR 30 菌株平均高出 5.76%。BR 20 和 BR 30 菌株作为混合发酵菌种用在黄酒生产中可缩短发酵时间、提高原料利用率并且增加出酒率。

关键词: 黄酒; 酵母菌; 发酵性能; 抗逆性

文章编号: 1673-9078(2015)8-261-267

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2015.8.041

Screening for Quality Strains of Yeast from Yellow Rice Wine and Stress Resistance Analysis

YANG Yi-jin^{1,2}, YU Jian-shen^{2,3}, XIA Yong-jun^{1,2}, FANG Yi-qun³, NI Bin³, WANG Guang-qiang², AI Lian-zhong^{1,2}

(1.School of Medical Instrument and Food Engineering, University of Shanghai for Science and Technology, Shanghai 200093, China) (2.Shanghai Engineering Research Center of Chinese Rice Wine, Shanghai 200093, China) (3.Shanghai Jinfeng Wine

Co.,LTD, Shanghai 200120, China)

Abstract: Four strains of yeast, namely BR 20, BR 25, BR 26 and BR 30, with preferable values for initial fermentation capacity, alcohol-producing ability, and fermentation performance were isolated from the main fermentation broth, yeast starter culture as well as from industrial units in the Shanghai area producing yellow rice wine. These four strains were identified as *Saccharomyces cerevisiae* by 5.8S rDNA-ITS sequence analysis. These four strains were analyzed in terms of tolerance to high concentrations of ethanol, sugar, and lactic acid as well as high osmotic pressure. The results showed that not only could the BR 20 and BR 30 strains withstand 18% alcohol concentration, but they could also adapt to high osmotic pressures of up to 1.6 mol/L. On the other hand, BR 20 and BR 26 strains had preferable growth capacity in the presence of high content of lactic acid, up to 54 g/L, while BR 30 strain showed highest tolerance to sugar, at 40% concentration. Thus, BR 20 and BR 30 strains showed highest resistance to stress and were chosen for further experiments. Comparison of the fermentation efficiency of BR 20 and BR 30 strains showed that the average substrate utilization rate of BR 20 strain was 1.67% higher than that of the BR 30 strain, and the average ethanol yield of BR 20 strain was 6.76% higher than that of the BR 30 strain. Thus, the use of the BR 20 and BR 30 strains as hybrid strains for wine fermentation from yellow rice will reduce fermentation time, improve the utilization of raw materials, and increase alcohol yield.

Key words: Chinese yellow rice wine; yeast; fermentation performance; stress resistance

发酵是用来保持和提高食物风味和营养价值最古老的方法。在我国, 以谷物(南方主要是糯米, 北

收稿日期: 2014-11-04

基金项目: 上海市产学研合作年度计划(沪 CXY-2013-51); 上海市农业科技成果转化资金项目(133919N1000); 上海市研究生创新基金项目

作者简介: 杨昶津(1991-), 女, 硕士, 研究方向: 酿造微生物选育

通讯作者: 艾连中(1976-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 食品微生物资源开发利用

方主要是黍米、黑米和玉米)为原料, 经麦曲和酒母经糖化和发酵制成的黄酒, 作为我国最古老的酒种, 与啤酒、葡萄酒一起并称为世界三大古酒。它利用药剂和麦曲等所持有的多种微生物的共同作用下, 进行开放式的“双边发酵”, 将原料中的淀粉糖化, 酵母利用糖生成酒精, 蛋白质和脂肪等成分经微生物作用后变成了有机酸、氨基酸、酯及杂醇油, 由于其营养物质丰富, 素有“液体蛋糕”的美称。

黄酒酿造过程中,酵母作为关键微生物,是发酵重要的动力源。酵母菌不仅对发酵醪内的糖进行分解或同化淀粉和糊精,产生乙醇,同时,酵母发酵性能的优劣,代谢产物的差异直接影响到黄酒的风味、口感和出酒率。在所有酿制酒中,要数黄酒的酒精含量14~20%最高,比起葡萄酒的8%~18%和啤酒的3%~6%都高,所以优良的酵母菌种是酿制高产优质黄酒的前提。黄酒发酵用醪,大米与水的比例为1:2左右,而啤酒糖化醪中麦芽和水的比例为1:3.5~4.2,可见黄药用醪相当浓厚^[1]。低温长时间的后发酵,随着酒精的逐渐积累,会对酵母细胞产生毒害作用,并且细胞膜是其冲击的主要目标^[2],影响酵母的生长增殖,进而影响最终出酒率;浓厚的醪液,会造成发酵初期环境中的渗透压较高,20%以上的糖或盐浓度所形成的渗透压即会对酵母生长产生抑制作用^[3],进而影响酵母进行进一步的生长和发酵功能。此外,发酵醪液中含多种有机酸(乳酸为主要成分之一)不仅可用于调节发酵醪的酸度,同时还可抑制杂菌,但随着发酵过程深入进行,逐渐累积的乳酸作为弱酸具有细胞膜渗透性,亦会对细胞产生明显毒害作用^[4]。为避免发酵过程发生阻遏或迟滞现象,就要求酵母菌种必须具备足够的胁迫应答能力来抵御其所造成的影响。因此筛选出起酵速度快、产酒能力强、优良发酵性能,同时耐高渗透压、耐高酒精、耐酸的酵母菌株,作为理想的发酵剂用于优质黄酒的酿造生产。

酵母抵御不良环境的能力对于黄酒发酵过程的顺利进行和生产效率的高低密切相关。我国黄酒消费的优势群体主要集中在江浙沪一带,目前对于浙江地区黄酒酵母的筛选与发酵习性已有较多相关的研究报告。因此,本文在上海地区黄酒企业采样,分析研究黄酒酵母的发酵性能以及抵抗外界环境胁迫的能力,筛选出具有优良抗逆性的黄酒酵母对于黄酒发酵工业具有重要的意义。

1 材料与amp;方法

1.1 材料

1.1.1 原料

主发酵液、酒母和酒糟:上海金枫酿酒有限公司

1.1.2 培养基

YPD琼脂培养基:葡萄糖20 g/L,酵母浸粉10 g/L,蛋白胨20 g/L,琼脂2%。于115℃下灭菌20 min,冷却后备用。

TTC下层培养基:YPD琼脂培养基。

TTC上层培养基:TTC 0.5 g/L,葡萄糖5 g/L,

琼脂2%。

种子培养基:葡萄糖20 g/L,酵母浸粉10 g/L,蛋白胨20 g/L。于115℃下灭菌20 min,冷却后备用。

麦芽汁发酵培养基:取一定量的麦芽汁培养基溶于水中,调整糖度为15 P,分装100 mL于250 mL的三角瓶内,115℃下灭菌20 min,冷却后备用。

1.1.3 主要仪器设备

3-18K型离心机,德国sigma公司;PB-10普及型pH计,德国Sartorius公司;气相色谱仪7820A,Agilent公司;Gel Doc XR+凝胶成像系统,Bio-Rad公司;S1000 PCR仪,Bio-Rad公司。

1.2 实验与方法

1.2.1 酵母菌的分离纯化

将所采集的黄酒相关样品梯度稀释后,涂布并划线于YPD琼脂培养基上,置于28℃恒温培养箱中培养48 h,挑取可疑菌落多次纯化后接种于YPD斜面培养基上于4℃进行保存。

1.2.2 产气性能测定

采用杜氏发酵^[5],将2%的种子液接种于装有杜氏小管的YPD液体培养基中,置于28℃培养48 h。记录各酵母菌株的产气时间,以及在规定时间内产气量,初步比较各株酵母菌的起酵能力。

1.2.3 产酒精性能测定

用TTC显色培养基进行筛选。将分纯的菌株点种于YPD培养基上,28℃培养48 h,倒入TTC上层培养基,置于30℃恒温培养箱中避光培养2~4 h,由菌落呈色的强弱来判断酵母菌株的产酒精能力,颜色愈红的菌株产酒精能力愈强^[10]。

1.2.4 发酵性能测定^[6]

以2%的接种量将种子液接入15 P麦芽汁发酵培养基中,置于28℃的恒温培养箱中培养,每隔12 h进行称重,并记录失重情况,待失重小于0.2 g时,可认为发酵基本完成,停止培养。比较各菌株的逐日失重和总失重情况,筛选出失重快和总失重量大的酵母菌,并对发酵液的残还原糖含量、总酸度含量、酒精浓度进行测定分析。

1.2.5 酒精耐受性测定

向已灭菌的YPD培养基中加入不同体积的无水乙醇,使得培养基中的酒精体积分数分别为10%、12%、14%、16%、18%(V/V),向其内装入杜氏小管,接入菌株,置于28℃恒温培养48 h,记录各杜氏小管内的产气量。

1.2.6 高糖耐受性测定

配制糖浓度分别为20%、30%和40%的YPD培

培养基,分装 100 mL 不同糖浓度的培养基于 250 mL 三角瓶中,115 °C 灭菌 20 min,冷却后分别接入 2% 的活化酵母,以 140 r/min 于 28 °C 摇床培养 48 h,结束后测定培养液的菌体浓度,以生长状况表征菌株对高浓度糖的耐受性。

1.2.7 乳酸耐受性测定

向 YPD 培养基中加入一定质量的乳酸,使其浓度为 54 g/L,取 100 mL 含乳酸的 YPD 培养基于 250 mL 三角瓶中,115 °C 灭菌 20 min,冷却后分别接入 2% 的活化酵母,以 140 r/min 于 28 °C 摇床培养 48 h,结束后测定培养液的菌体浓度,以生长状况表征菌株对高浓度乳酸的耐受性。

1.2.8 渗透压耐受性测定

向 YPD 培养基中加入不同质量的氯化钠,使其浓度分别为 1.0 mol/L、1.2 mol/L、1.4 mol/L、1.6 mol/L、1.8 mol/L 和 2.0 mol/L,分别装 100 mL 不同氯化钠浓度的 YPD 培养基于 250 mL 三角瓶中,115 °C 灭菌 20 min。冷却后分别接入 2% 的酵母种子液,以 140 r/min 于 28 °C 摇床培养 48 h,结束后测定菌液的 OD₆₀₀ 值,同时做一接种后经灭活的培养基作为空白对照。

1.3 分子鉴定

根据参考文献^[7],提取基因组 DNA,并用作 PCR 扩增的 DNA 模板。rDNA-ITS 序列扩增以及测序所用的引物为 ITS1(5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3')和 ITS4(5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3')^[8],由上海生工生物工程技术有限公司合成。PCR 反应体系(20 μL): ddH₂O 13.0 μL, 10×Taq Buffer 2.0 μL,上游引物(20 μM) 0.5 μL,下游引物(20 μM) 0.5 μL, Mg²⁺(25 mmol/L) 1.5 μL, dNTP(10 mmol/L) 0.5 μL, Taq DNA 聚合酶(5 U/L) 1.0 μL,模板 1.0 μL。反应条件为:94 °C 5 min; 94 °C 30s, 55 °C 1 min, 72 °C 1 min, 35 cycles; 72 °C 10 min。

1.4 分析方法

1.4.1 菌体浓度的测定

取 10 mL 菌体培养液,3000 r/min 离心 3 min 后,上层液体再以 1000 r/min 离心 10 min,倒去上清液待用,沉淀物(菌体)于 105 °C 烘干至恒重后称量。

1.4.2 还原糖浓度的测定

以 3,5-二硝基水杨酸法测定发酵液中的还原糖浓度。

1.4.3 发酵液酸度的测定

参照中华人民共和国国家标准 GB/T13662-2008,采用 NaOH 直接滴定法。

1.4.4 酒精含量的测定

采用 Agilent GC 7820A 气相色谱仪以 1-丙醇作为内标定量分析发酵液中的酒精浓度。色谱条件:毛细管柱 HP-5(30 m×320 mm×0.25 μm,Agilent),检测器为 FID,温度为 250 °C;进样口温度 200 °C;程序升温条件:起始温度 40 °C,保持 1 min,后以 5 °C/min 的升温速率升至 80 °C,保持 1 min,再以 20 °C/min 的升温速率升至 180 °C;载气为高纯氮气,流速为 2.5 mL/min,氢气流速为 40 mL/min,空气流速为 400 mL/min,尾吹流量为 20 mL/min;分流比 10:1,进样量 0.5 μL。

1.5 数据分析

每组实验设置三个平行样,实验结果采用 Excel 和 SPSS 处理和统计分析。

2 结果与讨论

2.1 酵母菌的初筛结果

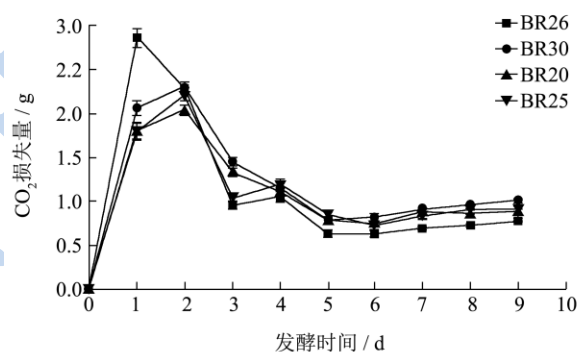


图 1 发酵速率曲线 (n=3)

Fig.1 Fermentation rate curve (n=3)

黄酒样品分离纯化得到 24 株酵母菌,经过产气实验与 TTC 平板显色实验,挑选杜氏小管内产气量大以及 TTC 显色呈深红色的菌株,最终得到 9 株酵母菌,进行发酵性能的测定,结果见表 1。酿酒过程中通常会采用 CO₂ 损失量来表征酵母菌株的发酵能力和发酵强度。将总失重量最多的 BR 25、BR 26 和 BR 30 菌株进行发酵速率曲线的绘制,如图 1。可知 BR 30 菌株的发酵能力最强,初期发酵适应性较强,但发酵后劲却一般;BR 26 菌株次之,能最迅速地启动发酵,发酵后劲不如 BR 30 菌株;BR 20 和 BR 25 菌株的发酵能力接近,BR 25 菌株的起始发酵能力强于 BR 20 菌株,后期发酵能力却略低于 BR 25 菌株。BR 20 菌株的乙醇浓度 30.58 g/100 mL 与总酸含量 0.15 g/100 mL 为 9 株菌中最高,但是底物利用情况一般;BR 24、BR 28 和 BR 30 菌株的底物消耗较充分,但 BR 24 和

BR 28 菌株的发酵性能与产酸能力一般。故选出 BR 20、BR 25、BR 26 和 BR 30 菌株进行进一步研究。

表 1 酵母菌的初筛结果 (n=3)

Table 1 Preliminary screening result of yeast strains (n=3)

菌株	产气时间/h	产气量	TTC 显色	CO ₂ 总失重量/g	发酵液总酸(以乳酸计)/(g/100 mL)	发酵液残还原糖量(g/L)	乙醇浓度/(g/100 mL)
BR 20	12	++++	深红	10.37±0.14	0.15±0.02	0.192±0.02	30.58±0.02
BR 24	24	+++	深红	9.96±0.31	0.14±0.03	0.174±0.02	27.39±0.01
BR 25	12	++++	深红	10.46±0.22	0.13±0.01	0.204±0.03	22.58±0.01
BR 26	12	+++	深红	10.62±0.23	0.14±0.03	0.192±0.02	28.79±0.02
BR 28	24	+++	深红	9.76±0.26	0.13±0.04	0.178±0.02	28.79±0.03
BR 29	12	+++	微红	9.25±0.18	0.14±0.03	0.198±0.01	22.99±0.02
BR 30	8	++++	深红	11.41±0.19	0.15±0.02	0.186±0.03	27.78±0.01
BR 41	12	++++	深红	9.72±0.21	0.14±0.01	0.212±0.02	25.11±0.03
BR 42	18	+++	深红	9.74±0.28	0.15±0.03	0.236±0.02	23.28±0.03

注：“++++”表示杜氏小管内充满气体；“+++”表示杜氏小管内有 3/4 气体。

2.2 分子鉴定结果

随着分子生物学技术的发展和广泛应用，核糖体 RNA 基因的内转录间隔区也被广泛地应用于酵母菌的分类与鉴定。对初步筛选结束后得到的 BR 20、BR 25、BR 26 和 BR 30 菌株进行基因组 DNA 的提取，使用引物 ITS1/ITS4 对上述 4 株菌株进行扩增，电泳图谱如下图 2。其中 BR 20 与 BR 25 菌株的扩增产物浓度较 BR 26 和 BR 30 菌株高，4 株菌的 PCR 扩增产物片段大小约为 700 bp，与 ITS 目标序列的长度一致。将扩增产物进行测序，利用序列 BLAST 搜索 NCBI 核酸数据库，获取与其同源的其它酵母菌株的 ITS 序列，确定 BR 20、BR 25、BR 26 和 BR 30 菌株均为酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*)。

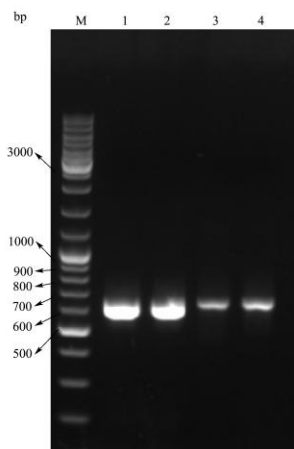


图 2 酵母基因组 PCR 产物的电泳图谱

Fig.2 Electrophoresis of yeast genome polymerase chain reaction(PCR) products

Note: M: maker; 1: BR 20 strain; 2: BR 25 strain; 3: BR 26 strain;

4: BR 30 strain.

2.3 酵母菌的抗逆性结果分析

2.3.1 酒精耐受性分析

黄酒的后发酵期间，发酵醪中酒精含量可高达 15% 及以上，酒精含量不断累积，会抑制酵母细胞的生长和发酵的酒精产率。因此，需要筛选出耐受高浓度酒精的酵母菌株以更好地适应低温长时间后发酵。4 株酵母对不同酒精浓度的耐受结果如表 2。可知，随着培养基中酒精含量的逐渐增加，杜氏小管内的气体含量逐渐减少。在酒精浓度为 16% 时，BR 26 菌株的杜氏小管内没有产气现象，BR 25 菌株在酒精浓度大于 16% 时停止生长；BR 20 和 BR 30 菌株可耐受 18% 的酒精浓度。国内一些学者从民间自制黄酒以及绍兴黄酒中筛选得到许多较好的野生黄酒酵母，其酒精耐受浓度普遍在 12%~16% 之间^[9-10]，耐受酒精程度并不理想。也有学者^[11]将黄酒中筛选所得的野生酵母菌株经诱变选育，在 30℃ 时可耐受 19% 酒精度的菌株。

表 2 不同酵母的酒精耐受性 (n=3)

Table 2 Alcohol tolerance of different yeast strains

菌号	培养基含酒精体积分数/%				
	10	12	14	16	18
BR 20	++++	+++	++	++	+
BR 25	++++	++	+	+	-
BR 26	++++	++	+	-	-
BR 30	++++	++	++	+	+

注：“++++”表示杜氏小管内充满气体；“+++”表示杜氏小管内有 3/4 气体；“++”表示杜氏小管内有 1/2 气体；“+”表示杜氏小管内有 1/4 气体；“-”表示杜氏小管内无气体。

2.3.2 高糖耐受性分析

黄酒发酵具有“双边发酵”的特点，即糖化和发

酵并行进行,黄酒的酒精含量在 15%~20%,因此需要发酵用醪含糖量在 32% 以上,但是糖浓度太高会对酵母细胞产生一定的胁迫性,影响酵母的生长繁殖。由图 3 可知,随着培养基糖浓度的增加,不同的酵母菌株表现出不同的适应性。BR 20 菌株随着糖浓度的增加,酵母菌体浓度先增加后减少,在培养基糖浓度为 30%时,菌体浓度达最大 3.03 g/L,表现出最好的生长状况。在糖浓度为 40%时,菌株生长受到一定程度的抑制,菌体浓度为 2.36 g/L,菌株对高糖的耐受性一般;BR 25 和 BR 26 菌株随着糖浓度的增加,菌体浓度逐渐降低,细胞生长受糖浓度的抑制程度逐渐增加,在糖浓度为 20%时,生长状况最好,菌体浓度分别为 2.88 g/L 和 2.85 g/L,在糖浓度为 40%时,菌株浓度分别为 1.7 g/L 和 1.68 g/L,生长繁殖明显减弱,对高糖的耐受性较差;BR 30 菌株随着糖浓度的增加,酵母菌体浓度逐渐增加,在糖浓度为 40%时,菌体浓度达到最大值 2.53 g/L,对高糖的耐受能力较强。随着培养基中糖浓度的变化,酵母菌生长状况的变化趋势与金耀光^[12]和魏东^[13]等的研究结果基本一致。

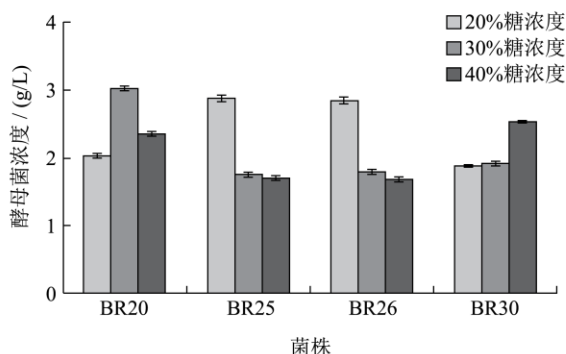


图 3 不同酵母的高糖耐受能力 (n=3)

Fig.3 Tolerance of different yeast strains (n = 3) to high sugar concentrations

2.3.3 乳酸耐受性分析

黄酒发酵初期温度较高,营养丰富,酵母和乳酸杆菌迅速生长,此时发酵作用虽较弱,但乳酸含量迅速增加;发酵后期温度回落,此时主要是低温乳酸杆菌生长、繁殖、发酵,乳酸继续增加,但增幅缓慢。乳酸可调节发酵醪的酸度,使杂菌生长受到抑制,另外可与酵母发酵产生的乙醇生成具有特殊香气的乳酸乙酯,但乳酸也会对酵母细胞产生一定程度的毒害作用。本实验利用高浓度乳酸条件下酵母的生长来评价菌株的乳酸耐受能力,实验结果如图 4 所示。BR 25 和 BR 30 菌株的生长受到高浓度乳酸的强烈抑制,菌体浓度仅为 0.09 g/L 和 0.08 g/L; BR 20 菌株受乳酸的抑制程度最小, BR 26 菌株次之; BR 20 和 BR 26 菌株对高浓度乳酸表现出较好的适应性,菌体浓度分别

为 1.33 g/L 和 0.93 g/L。

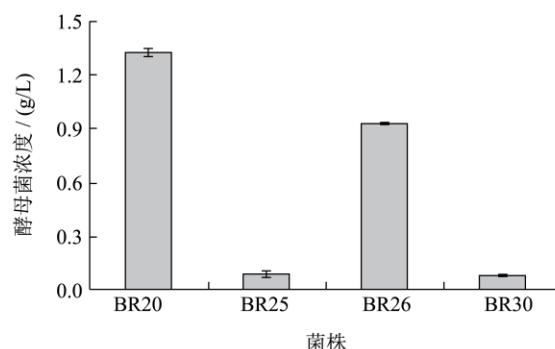


图 4 不同酵母的乳酸耐受能力 (n=3)

Fig.4 Tolerance of different yeast strains (n = 3) to lactic acid

2.3.4 高渗透压耐受性分析

黄酒发酵用醪中大米和水的比例为 1:2 左右,发酵用醪相当浓厚,故高渗透压胁迫主要发生在发酵初期,高渗透压使酵母细胞失水、形态改变,影响酵母生长;同时环境中一些对细胞有害的溶质进入细胞内,进一步影响酵母的生存能力。由表 3 可知,高渗透压对酵母生长具有明显的抑制作用。氯化钠浓度为 1.0 mol/L 时,各菌株均呈现出良好的生长状况;在氯化钠浓度在 1.2~1.6 mol/L 范围内,高渗透压对 BR 20、BR 26 和 BR 30 菌株的抑制作用逐级增加,当氯化钠浓度为 1.6 mol/L 时,三株菌均能生长,对此渗透压条件耐受性差异不大;当氯化钠浓度为 1.8 mol/L 时所有菌株均无法生长。高渗透压对 BR 25 菌株的抑制作用最为明显,在 1.4 mol/L 的氯化钠浓度下几乎无法生长。金耀光^[12]研究发现筛选出的清酒酵母和 3 株黄酒工厂常用酵母可耐受 1.8 mol/L 的渗透压,相较本实验所得的酵母菌株有更好的渗透压耐受性能。杨鲁君^[11]、刘向勇等^[14]等对常用工业酵母菌株、安琪酵母菌株以及从绍兴酒厂筛选所得的酵母菌株进行耐受渗透压分析研究,大部分筛选得到的黄酒酵母只能耐受 1.0 mol/L~1.2 mol/L 的渗透压,提升渗透压压力,酵母菌株的生长会受到严重抑制。

表 3 不同氯化钠浓度下酵母菌株的 OD₆₀₀ (n=3)

Table 3 OD₆₀₀ of yeast strains with different concentrations of sodium chloride

菌株	培养基中氯化钠浓度/(mol/L)					
	1	1.2	1.4	1.6	1.8	2
BR 20	1.34±0.01	1.10±0.02	0.54±0.02	0.25±0.01	-	-
BR 25	1.15±0.02	0.56±0.02	0.006±0.01	-	-	-
BR 26	1.37±0.03	0.94±0.03	0.54±0.01	0.24±0.01	-	-
BR 30	1.34±0.02	1.02±0.01	0.66±0.02	0.26±0.01	-	-

注:“-”表示菌株未生长。

2.4 底物利用率与乙醇产率结果比较分析

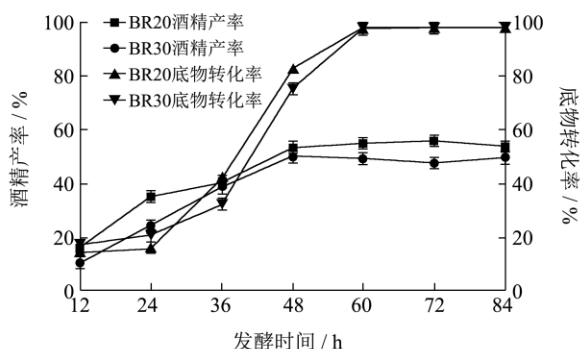


图5 BR 20和BR 30菌株的发酵效率比较 (n=3)

Fig.5 Comparison of fermentation efficiency between BR 20 and BR 30 strains (n = 3)

BR 20和BR 30菌株可耐受18%的酒精,对1.6 mol/L高渗透压有较好的适应性, BR 20和BR 30菌株分别在54 g/L的乳酸浓度和40%糖浓度条件下具有较好的生长状况,故筛选出综合抗逆性能较好的BR 20和BR 30菌株进行底物利用率与产物产率分析,结果比较如图5。在发酵初期的24 h内, BR 20菌株对底物的利用率高于BR 30菌株,从36 h后, BR 20菌株41.93%的底物转化率高于BR 30菌株31.87%的底物利用率;此后随着底物的转化,直至84 h后, BR 20菌株98.47%的最高底物利用率始终高于BR 30菌株98%的最高底物转化率。在0~84 h内, BR 20菌株的酒精产率始终高于BR30菌株; BR 20和BR 30菌株的酒精产率在0~48 h内都快速增加; BR 20菌株在48~72 h内的酒精产率的增长速率大幅降低,在72 h时达到最大产率55.88%,而BR 30菌株的酒精产率在48 h后呈下降趋势,在48 h达到最大产率50.03%。BR 20菌株的底物利用率较BR 30菌株平均高出1.67%, BR 20菌株的酒精产率较BR 30菌株平均高出5.76%。

3 结论

从起酵能力、产酒精能力和发酵能力优劣出发,筛选在外界不良环境条件胁迫下抗逆性能强的酵母菌株对黄酒酿造工业具有重要的意义。从所采集样品中的主发酵液、酒母和酒糟中分离得到4株起酵能力、产酒精能力和发酵性能较好的BR 20、BR 25、BR 26和BR 30酵母菌株。经5.8S rDNA-ITS测序分析,鉴定分离筛选所得的4株菌为酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)分析研究4株菌对高浓度乙醇、高糖浓度、高浓度乳酸和高渗透压的耐受性,最终筛选出可耐受18%的酒精浓度,对1.6 mol/L高渗透压有较好的适应

性,综合抗逆性较强的BR 20和BR 30菌株。发酵动力学分析结果表明BR 20菌株的底物利用率较BR 30菌株平均高出1.67%, BR 20菌株的乙醇产率较BR 30菌株平均高出5.76%。其中, BR 20菌株虽有较好的底物利用效率,但发酵性能却滞后于BR 30菌株。总体来说, BR 20和BR 30菌株起酵速度快,发酵性能好,产酒精能力强,具有优良的抗逆性能,作为混合发酵菌种,用在黄酒生产中可缩短发酵时间、提高原料利用率并且增加出酒率。在日后的研究中,通过两个菌株的发酵性能定向驯化或是原生质体融合,将会使菌株的性能进一步提高,从而获得抗逆性和发酵性能综合指标更加优良的黄酒酵母菌株,提高黄酒酿造的生产效率和品质。

参考文献

- [1] Que F, Mao L C, Zhu C G. Antioxidant properties of Chinese yellow wine, its concentrate and volatiles [J]. LWT-Food Science And Technology, 2006, 39(2): 111-117
- [2] Marza E, Camougrand N, Manon S. Bax expression protects yeast plasma membrane against ethanol-induced permeabilization [J]. FEBS Letters, 2002, 521(1-3): 47-52
- [3] Stanley D, Bandara A, Fraser S, et al. The ethanol stress response and ethanol tolerance of *Saccharomyces cerevisiae* [J]. Journal of Applied Microbiology, 2010, 109(1): 13-24
- [4] Krebs H A, Wiggins D, Stubbs M, et al. Studies on the mechanism of the antifungal action of benzoate [J]. Biochemical Journal, 1983, 214(3): 657-663
- [5] Cheng M C, Chang R C, Dent D F, et al. Breeding an amyolytic yeast strain for alcoholic beverage production [J]. Appl Biochemical Biotechnology, 2011, 163(6): 693-706
- [6] Asano T, Kurose N, Tarumi S. Isolation of high-malate-producing sake yeasts from low-maltose-assimilating mutants [J]. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2001, 92(5): 429-433
- [7] Drumonde-Neves J, Vieira E, Lima M T, et al. An easy, quick and cheap high-throughput method for yeast DNA extraction from microwell plates [J]. Journal of Microbiological Methods, 2013, 93(3): 206-208
- [8] Naumov G I, Lee C F, Naumova E S. Molecular genetic diversity of the *Saccharomyces* yeasts in Taiwan: *Saccharomyces arboricola*, *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces kudriavzevii* [J]. Antonie van Leeuwenhoek, 2013, 103(1): 217-228

- [9] 陈胜,刘素纯,黎耀波,等.酿酒酵母发酵性能的比较[J].中国酿造,2011,11:76-79
CHEN Sheng, LIU Su-chun, LI Yao-bo, et al. Comparison of the fermentation performance of several yeast strains [J]. China Brewing, 2011, 11: 76-79
- [10] 杨鲁君,蒋予箭,李予动.黄酒酵母优良抗逆菌株的筛选、鉴定及发酵特性研究[J].中国食品学报,2013,13(9):71-77
YANG Lu-jun, JIANG Yu-jian, LI Yu-dong. Screening, identification and fermentation characteristics of a Chinese rice wine yeast strain with high stress tolerance [J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2013, 13(09): 71-77
- [11] 夏艳秋,朱强,汪志君,等.耐受性黄酒酵母 YS6.2.5 的选育及初步应用[J].食品科学,2010,31(23):228-232
XIA Yan-qiu, ZHU Qiang, WANG Zhi-jun, et al. Breeding and application of tolerant Chinese rice wine yeast YS 6.2.5 [J]. Food Science, 2010, 31(23): 228-232
- [12] 金耀光,范文来,徐岩,等.黄酒酿造酵母耐受性能的研究[J].酿造科技,2008,6:17-21
JIN Yao-guang, FAN Wen-lai, XU Yan, et al. Research on the tolerance of yellow rice wine yeast [J]. Liquor-Making Science & Technology, 2008, 6: 17-21
- [13] 魏东,陈娇敏,巴音克西克.两种微藻对高浓度酵母发酵废水中细胞耐受能力的比较[J].现代食品科技,2013,29(12):2839-2843
WEI Dong, Chen Jiao-min, BAYIN Ke-xi-ke. Comparison of cell tolerance capacity of two microalgae species to high concentration wastewater from yeast fermentation [J]. Modern Food Science and Technology, 2013, 29(12): 2839-2843
- [14] 刘向勇,张小华,鲍晓明.酿酒酵母工业菌株胁迫条件耐受性分析[J].中国酿造,2006,1:8-11
LIU Xiang-yong, ZHANG Xiao-hua, BAO Xiao-ming. Study on the stress resistance of *Saccharomyces cerevisiae* industrial strains [J]. China Brewing, 2006, 1: 8-11