

适合米酒酿造酵母的分离鉴定 及葡萄糖发酵特性研究

伍保龙,伍时华*,和晶晶,应玲云,易 弋,黄翠姬
(广西科技大学 生物与化学工程学院,广西柳州 545006)

摘要:采用稀释涂布法,从本地优质米酒酒曲中分离得到 27 株酵母菌,经初筛和复筛,得到一株产酒精能力强的酵母菌 5-1Y。通过菌落、菌体形态观察、生理生化实验和 26S rDNA 序列分析,鉴定出 5-1Y 为酿酒酵母。将处于对数生长期的菌种接入含不同葡萄糖浓度(50~320g/L)的 YEPD 培养基,测定发酵液中葡萄糖浓度和菌体死亡率变化,研究 5-1Y 在不同葡萄糖浓度下的发酵特性。实验结果表明:较高的初始葡萄糖浓度会明显影响该酵母的发酵产酒精能力,5-1Y 的最适宜高葡萄糖发酵浓度为 230g/L。

关键词:酒曲,分离鉴定,发酵特性

Isolation, identification and glucose fermentative characterization of high alcohol yield yeast from rice wine starter

WU Bao-long, WU Shi-hua*, HE Jing-jing, YING Ling-yun, YI Yi, HUANG Cui-ji

(School of Biological and Chemical Engineering, Guangxi University of Science and Technology, Liuzhou 545006, China)

Abstract: In this paper, 27 yeasts were isolated from the local wineries and one strain with strong capacity of producing alcohol, named 5-1Y, was screened. The isolate was identified as *Saccharomyces cerevisiae* by morphology, biochemical tests and 26S rDNA analysis. The glucose concentration and the mortality of the isolate were detected continuously in YEPD medium, which contained various concentrations of glucose (50~320g/L), to analyze the fermentation characterization of this yeast. The results revealed that high concentration of initial sugar could affect the fermentation, and the suitable glucose concentration for 5-1Y was 230g/L.

Key words: rice wine starter; identification; fermentative characterization

中图分类号: TS201.3

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2014)17-0156-06

doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2014.17.025

我国传统米酒酒曲中有多种微生物,为酒体风味物质的形成提供了保障^[1]。酒曲在米酒生产中起着糖化、发酵和生香的作用,酒曲中的酵母菌是最重要的发酵菌种,主要分为产酒精的酒精酵母和产芳香物质的产酯酵母,其中酒精酵母是酒曲中主要的产酒功能菌,产酯酵母可产多种醇、醛、酯等芳香物质^[2]。酒精酵母的特性对酒的质量和发酵效率有较大影响。

经过大自然长期的选择作用,传统米酒酒曲中的酒化菌逐渐适应了当地的土壤,酿造出的米酒具有独特的地方特色。广西柳州、南宁和桂林等地有很多作坊式米酒酒厂,生产出的米酒美味可口,深受人们喜爱。因此,研究分析这些区域优良酒曲的生物多样性,分离鉴定出一株高产酒精酵母,研究其发

酵过程中的发酵特性,对提高米酒酿酒工业的发酵效率和产品质量,具有很重要的意义。

本研究从酒曲中分离筛选得到一株适用于酿造米酒的酵母,通过研究其葡萄糖发酵特性,为该酵母菌与其他具有特性功能菌株混合制成复合发酵菌用于酒类酿造提供直接或间接的依据。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

酒曲 广西象州某酒饼厂、桂林某酒厂和河池某酒厂。

高产酒精酵母(编号 GJ2008)、产香扣囊腹膜酵母(编号 YW12) 均为本实验室保藏菌种。

YEP 液体培养基:酵母膏 10g,蛋白胨 20g,用蒸馏水定容至 1000mL; YPD 培养基: YEP 液体培养基加入葡萄糖,糖浓度为 20g/L; YPD 固体培养基: YPD 培养基加入琼脂,琼脂浓度为 20g/L; Glucose 50g/L; YEPD 培养基: YEP 培养基中加入葡萄糖 50g/L; 碳源同化基础培养基、氮源同化基础培养基、麦氏培养基和 PDA 培养基^[3]; 以上培养基 115℃ 高温蒸汽灭菌 30min, 待用; 美兰染色液: 亚甲基蓝 0.1g, 二水合柠檬

收稿日期: 2014-01-08 * 通讯联系人

作者简介: 伍保龙(1987-),男,在读硕士研究生,研究方向:微生物代谢控制发酵。

基金项目: 广西科技攻关项目(桂科攻 0782003-2); 广西科技大学自然科学基金(校科自 1307105)。

酸三钠 20g,用蒸馏水定容至 1000mL。

SBA-40C 型生物传感仪 山东科学院生物研究所;Motic DMB5 数码显微镜 上海捷辰仪器有限公司;K5500 微量分光光度计 北京凯奥科技发展有限公司;高速冷冻离心机 220R 德国赫担驰公司;LS-B100 立式高压蒸汽灭菌锅 江阴滨江医疗设备有限公司;LRH-250 型生化培养箱 上海雷韵实验仪器制造有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 酵母菌的分离纯化 酵母菌的分离纯化参考文献[3]进行。

1.2.2 酵母菌的筛选 初筛:在无菌条件下,将通过分离纯化得到的多株酵母菌用接种环分别接种于 100mL 无菌 YPD 液体培养基并置于 30℃ 培养 18~24h,然后按 10% 的接种量分别接入装有 100mL 葡萄糖 100g/L YEPD 培养基的 250mL 小三角瓶中,30℃ 培养 72h,每 6h 取一次样,测量并绘出培养基中葡萄糖浓度曲线和酒精浓度曲线。筛选出发酵速率快、产酒精能力高和残糖含量少的酵母菌。并结合感官评定(感官评定的方法按照 GB/T10345-2007,并参考文献[4]进行),淘汰产杂味物质的酵母菌。筛选出的酵母菌作为复筛的出发菌株(菌株的编号规则:从三个酒厂获得的九种酒曲分别编号 1、2、3、4、5、6、7、8、9,从 1 号酒曲筛选出的菌株依次编号 1-1Y,1-2Y,1-3Y 等,依次类推)。

复筛:实验方法同初筛,只将葡萄糖 100g/L YEPD 培养基改为葡萄糖 200g/L YEPD 培养基。

1.2.3 酵母菌的生理生化实验和 26S rDNA 序列鉴定实验

1.2.3.1 生理生化实验 菌落和细胞形态、菌丝的形成、掷孢子的形成、糖类发酵实验、碳源同化实验、硝酸盐同化实验、子囊孢子的形成、在高渗透压培养基上的生长等实验参考文献[3,5-6],产生类淀粉化合物的测定参考文献[7]。

1.2.3.2 26S rDNA 序列鉴定实验 PCR 引物的选择:选择通用引物 NL1(5'-GCATAT CAA TAA GCG GAGGAA AAG-3')和 NL4(5'-GGT CCG TGT TTC AAG ACG G-3')[8](上海英俊生物技术有限公司合成)。

PCR 反应条件:94℃ 预变性 5min,30 个循环(94℃ 变性 60s,53℃ 退火 60s,72℃ 延伸 60s)后,72℃ 延伸 5min。将扩增目的产物胶回收,通过 TA 克隆将克隆序列送至上海英俊生物技术有限公司测序。将序列在 NCBI 数据库中进行 BLAST 比对分析,使用 MEGA 5.0 软件创建系统进化树。

1.2.4 酵母菌 5-1Y 的葡萄糖发酵特性研究 酵母菌悬液的制备方法:按照 1.2.2 中初筛的方法培养好种子液后,在无菌环境下取 40mL 已经活化好的酵母培养液,置于 50mL 无菌离心管中,9000r/min 离心 10min,弃上清后加入 40mL 无菌水洗涤 2 次,以除去残留的培养基。得到的菌体加入适量无菌水,充分振荡后待用。

将已灭菌好的葡萄糖 500g/L 溶液加入 YEP 基

础培养基中,用无菌水配制成葡萄糖浓度分别为 50、103、138、200、230、260、290 和 320g/L 等浓度的 YEPD 培养基(每个梯度做两个平行实验),加入酵母菌悬液,使酵母菌浓度约为 7×10^6 cells/mL。放入恒温培养箱,于 30℃、160r/min 恒温振荡培养 72h,期间每隔一定时间取样 1mL,9000r/min 离心 10min,上清液用 SBA-40C 型生物传感仪测定残葡萄糖浓度和乙醇浓度。离心后的酵母菌菌体用水补足 1mL 并充分振荡,取该菌悬液 100 μ L,经美兰染色后,利用血球计数板法测出酵母菌细胞数和死亡数^[9],另取该菌悬液用分光光度计测出菌悬液的 OD₅₆₀ 值。

2 结果与分析

2.1 酵母菌的分离与纯化

将分离出的多株酵母菌分别接种于 YPD 固体培养基上,于 25℃ 培养 3d,菌落为乳白色圆形,较大的、边缘锯齿或整齐、高凸或低凸起、表面粗糙或光滑;菌体均为椭圆形,出芽生殖,有不同的发酵产酒精能力。根据《酵母菌的特征与鉴定手册》^[4],初步将这些菌定为酵母菌。

2.2 酵母菌的筛选

2.2.1 酵母的初筛 通过测出发酵过程中二氧化碳失重、残葡萄糖浓度速率和发酵酒精度,对选出的 27 株酵母菌进行发酵实验。取 11 株有代表性的酵母菌作图(GJ2008 与 YW12 为对照菌株),这 11 株酵母菌的实验结果见图 1A~图 1D:

从图 1 中可以看出,酒曲里面的酵母菌都具有发酵能力,但差别较大,故选用适宜的酵母菌菌种用于米酒生产,对提高产品的品质有着不可忽视的作用。

由参考文献^[10]可知:葡萄糖浓度-时间曲线下面积(AUC)与葡萄糖的利用成正比,它代表葡萄糖被利用的程度。因此在相同初糖浓度和时间 AUC 越小表示糖利用速率越快。对比本实验室的高产酒精酵母(编号 GJ2008),通过图 1A~图 C 和表 1 可以看出,菌种 GJ2008、1-1Y 和 5-1Y 在相同 YEPD 培养基上酒精发酵效率高,糖利用率最快(发酵 12h 后,发酵液中的葡萄糖浓度达到最低,CO₂ 失重不再增加,发酵即结束);显然,3-1Y、2-5Y 和 YW12 等菌株的糖利用速率慢故被淘汰。3-1Y 和 2-5Y 虽然发酵速率慢,酒精发酵效率较低,但发酵过程中耗糖曲线平缓,产香味物质明显,具有产香酵母的一般性质,可能为产香酵母,故选 1-1Y、5-1Y、3-1Y 与 2-5Y 为复筛出发菌株。

2.2.2 复筛 测定了 27 株菌的部分发酵性能后,相同的方法对筛选出的 4 株菌种进行复筛,实验结果如图 2A~图 2D 所示。

由表 2A 可知 5-1Y、1-1Y 的 AUC 数值小且接近,这说明两株酵母发酵速率很快。从图 2A~图 2D 中可以看出酒精酵母 5-1Y 与 1-1Y 的发酵速率很快(5-1Y、1-1Y 和 GJ2008 的糖浓度曲线几乎重合),酒精产率均很高,品尝分数值比较理想,但由于 1-1Y 在用于酿酒时产 CO₂ 多,严重时会有泡沫溢出瓶口,给实验处理带来难度,因此选择 5-1Y 作为目

表1 葡萄糖浓度-时间曲线下面积

Table 1 The area under the glucose concentration-time curve(AUC)

菌株编号	3-1Y	2-5Y	YW12	7-1Y	7-2Y	1-1Y	3-2Y	5-1Y	6-2Y	GJ2008	3-3Y
AUC	3468	3228	3099	2526	2667	644	1073	667	1483	646.3	1700

注:表1中AUC的值是由图1计算而来(AUC的值由软件GraphPad-prism 5自动算出)。

表2 葡萄糖浓度-时间曲线下面积

Table 2 The area under the glucose concentration-time curve(AUC)

菌株编号	3-1Y	2-5Y	YW12	GJ2008	5-1Y	1-1Y
AUC	11565	11190	10980	2321	2199	2152

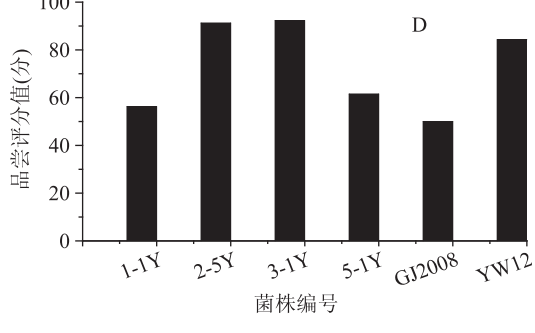
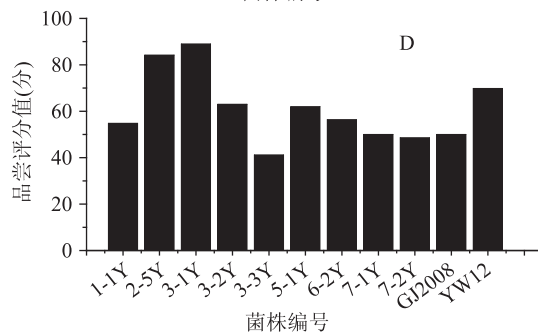
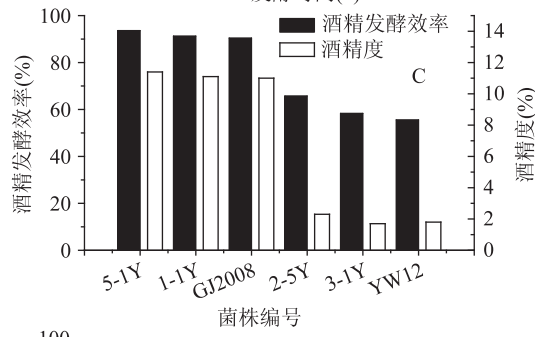
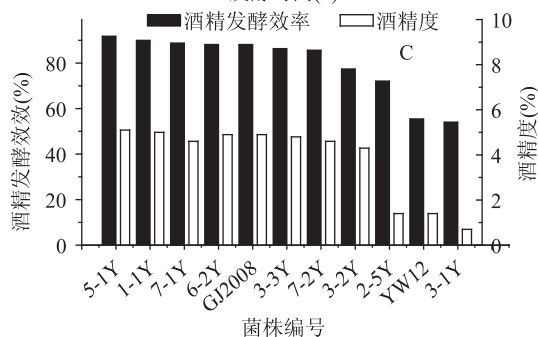
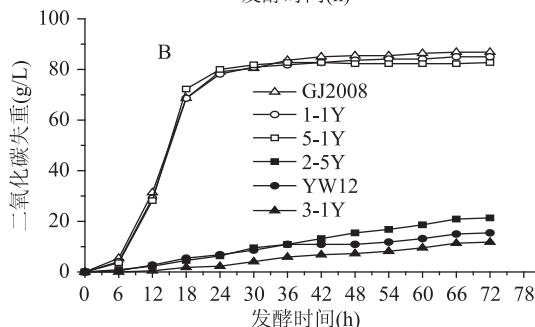
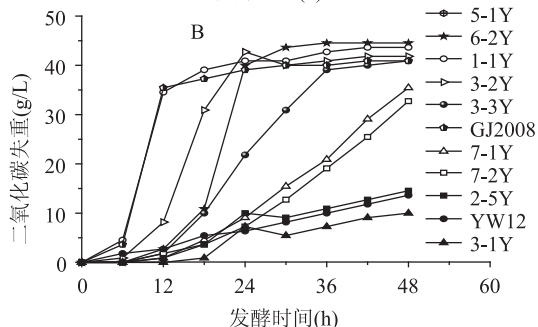
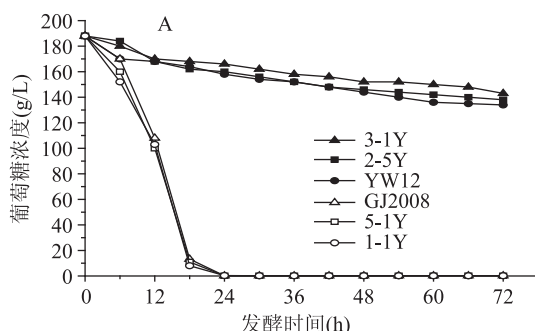
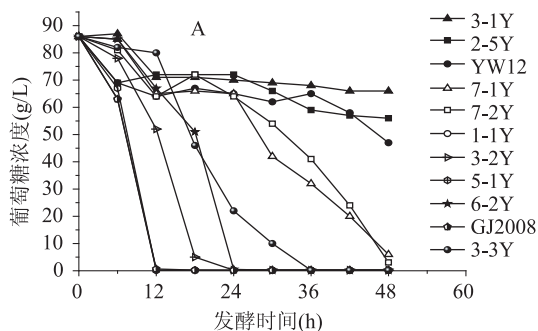


图1 酵母菌的初筛

Fig.1 The preliminary screening of yeast strains

图2 酵母的复筛

Fig.2 The secondary screening of yeast

的产酒酵母菌进行下一步实验。

2.3 酵母菌的鉴定

2.3.1 酵母的生理生化实验

2.3.1.1 5-1Y 的菌落及生理特征 菌落较大,圆形,不透明,凸起,表面光滑,边缘整齐,乳白色,单细胞个体为卵圆形,具有酒精酵母的一般特征;实验未观察到5-1Y 形成菌丝;通过孔雀绿染色法,观察到了

绿色的子囊孢子,每个子囊里含有1~4个子囊孢子,孢子呈椭圆形;在掷孢子的形成实验中未观察到5-1Y有散落的掷孢子。5-1Y菌株在YPD培养基上培养14d后,滴入碘液,培养液未变蓝色,说明5-1Y未产生类淀粉化合物;5-1Y菌株在含500和600g/L葡萄糖的YEPD培养基上均能长出菌落,表明5-1Y在高渗透压培养基上能够生长。

2.3.1.2 糖类发酵实验 酵母在发酵时,常常会伴有二氧化碳的生成,生成的二氧化碳会部分溶解于发酵液,并从发酵液中逸出^[11],因此采用“杜氏小管法”很难收集或收集不到这些发酵弱的菌株产生的气体,为了进一步说明5-1Y菌株不发酵乳糖,将表3中含乳糖的培养基放大到200mL,发酵3d,发酵液没有产生二氧化碳失重,发酵液不含乙醇,进一步说明该菌株不发酵乳糖。这与王镜岩等人的结论一致^[12]。

表3 5-1Y菌株糖类发酵结果

Table 3 The fermentation of different sugars in 5-1Y

菌株	果糖	麦芽糖	葡萄糖	乳糖	蔗糖
5-1Y	+++	+++	+++	-	+++

注:“+++”表示发酵强烈,“-”表示不发酵。

2.3.1.3 碳源和氮源同化实验 由表4可知,5-1Y能够利用除了乳糖以外的四种糖(果糖、麦芽糖、葡萄糖和蔗糖)作为营养物质进行细胞繁殖(菌体OD₅₆₀值增加),表明5-1Y能同化果糖、麦芽糖、葡萄糖和蔗糖,但不能同化乳糖。此外,该菌株不同化硝酸钾中的氮元素。

2.3.2 26S rDNA 序列鉴定实验 将5-1Y的26S rDNA D1/D2 区序列通过BLAST在NCBI中的基因库进行同源序列搜索,选取近亲菌株的26S rDNA D1/D2 序列进行比对,用MEGA 5 软件构建系统进化树。如图3所示:从图3中可以看出:5-1Y与酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)相似度达100%,因此可以确认5-1Y为酿酒酵母。

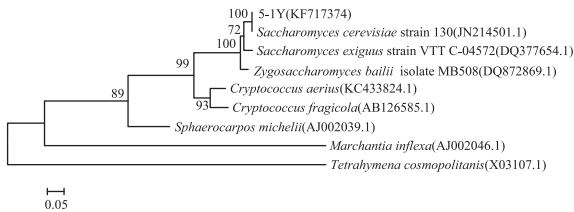


图3 5-1Y的26S rDNA序列与相关菌株的系统进化树

Fig.3 Phylogenetic tree based on the 26S rDNA sequence in 5-1Y and its closest relatives

注:括号里为GenBank的登录号。

表4 5-1Y菌株同化实验菌体OD₅₆₀值测量结果

Table 4 Assimilation reactions and OD₅₆₀ value of 5-1Y

项目	时间(d)	空白	果糖	麦芽糖	葡萄糖	乳糖	蔗糖	硝酸钾	硝酸铵
OD ₅₆₀ 值	0	0.0000	0.0101	0.0064	0.0070	0.0042	0.0040	0.0084	0.0061
	7	0.0000	0.3652	0.1854	0.1785	0.0048	0.2471	0.0105	0.1224
5-1Y同化结果	-	-	+	+	+	-	+	-	+

2.4 酵母菌5-1Y的葡萄糖发酵特性研究

分别测定了残葡萄糖、乙醇含量、酵母菌菌体OD₅₆₀值及酵母菌的死亡率等的变化情况,结果如图4所示。

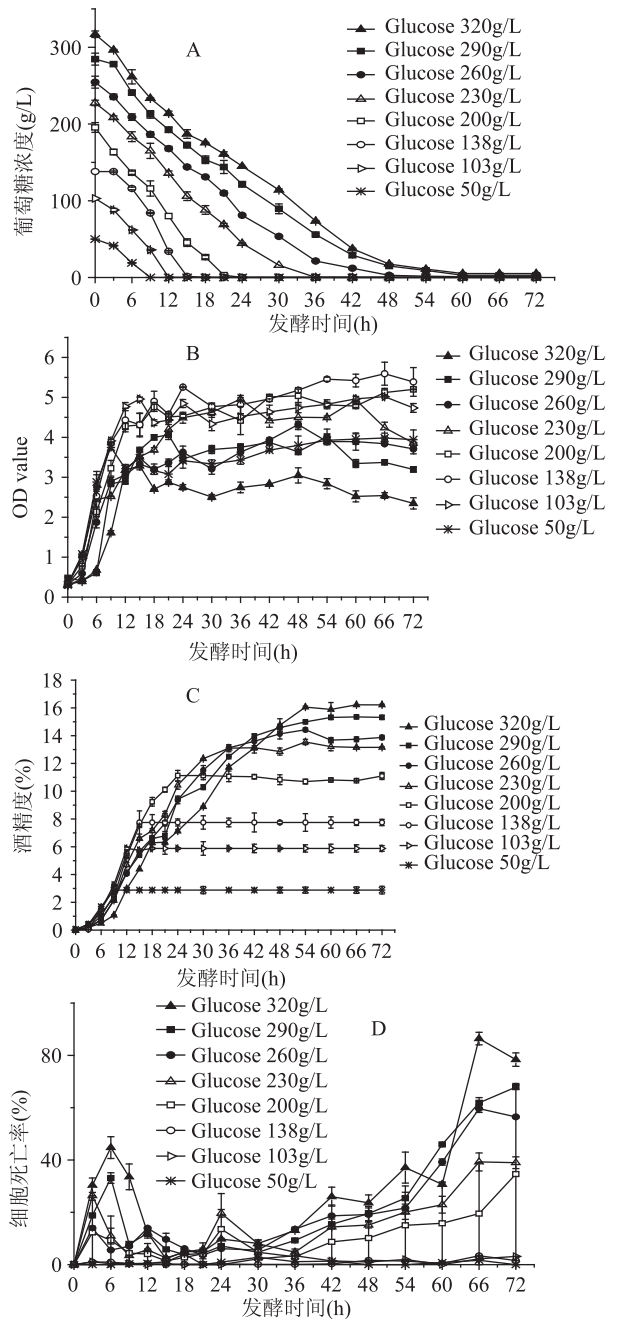


图4 不同初始糖浓度对酵母菌5-1Y发酵的影响

Fig.4 Fermentation of

different glucose content in 5-1Y

图4A和表6可以看出:发酵初糖浓度在230g/L

表5 葡萄糖浓度-时间曲线下面积

Table 5 The area under the glucose concentration-time curve(AUC)

初糖浓度(g/L)	320	290	138	260	230	200	138	50
AUC	7313	6392	4862	3509	2010	1332	718	261.7

表6 不同初糖浓度酒精发酵结果

Table 6 Fermentation result of different glucose content

初糖浓度(g/L)	50	103	138	200	230	260	290	320
残糖浓度(g/L)	0.08	0.08	0.08	0.08	0.09	0.93	2.93	5.1
酒精度(°)	2.88	5.88	7.75	11.10	13.16	13.87	15.32	16.22
糖利用率(%)	99.84	99.92	99.94	99.96	99.96	99.64	98.99	98.41
酒精发酵效率(%)	88.94	88.14	86.71	85.69	88.35	82.37	81.57	78.26

以下时,发酵结束后残糖浓度低于0.1g/L,培养基中的糖几乎全部被酵母利用;而初糖浓度为320g/L时,发酵72h后的残糖浓度为5g/L,稍微有点偏高,说明320g/L的初糖浓度不利于发酵。考虑到乙醇浓度太低,后续处理时难度和能耗成本增加,因此,在进行发酵时选择200~230g/L的初糖浓度作为适宜的糖浓度进行发酵。

由图4B可知,当发酵初糖浓度在0~138g/L范围内时,酵母菌的菌体浓度与初糖浓度成正相关关系,可见糖是酵母菌增殖的重要营养物质,糖浓度过低,则无法提供足够的营养物供酵母菌繁殖。当发酵初糖浓度在200~320g/L范围时,较高的渗透压环境使酵母菌的生长繁殖受到抑制,致使酵母菌的菌体浓度与初糖浓度成负相关关系。图4B中,酵母菌在320g/L的高初糖浓度培养基中培养时,细胞繁殖受到的抑制作用非常明显。发酵将结束,每条曲线都显示酵母的细胞数量都有些许下降,其中一个原因是由于发酵液中乙醇、脂肪酸和高级醇等代谢产物的累计,使酵母菌细胞机能变弱,进而导致细胞自溶^[13],而自溶后,细胞自身的组成物质会在酶促的作用下生成大量的氨基酸、多肽、核苷酸、甘露糖蛋白和脂肪酸等物质对酒的品质都有着促进或相反的作用,因此,在酿酒时就需要合理引导和利用酵母自溶现象的发生方向^[14]。

表5表明:初糖浓度为260g/L AUC是103g/L AUC的6.8倍,大于糖浓度比2.5(260/103=2.5),故总体上来看,初糖浓度越高发酵速率越慢。图4C表明:发酵产酒精速率与发酵初糖浓度成反比例关系,初糖浓度越高,产酒精越缓慢。结合图4C和4D可知:随着发酵的进行,酒精浓度逐渐提高,酵母的增殖能力越弱。酒精浓度达到约10°时,酵母的死亡率开始上升,这可能是由于酵母在发酵中产生的乙醇产物阻遏酵母自身细胞的增殖,改变细胞的活性,从而影响发酵速率和效率^[15]。然而据Louiero和Ferreira^[16]等人报道说:发酵液中的乙醇的浓度对细胞的毒性要远小于发酵过程中酵母体内的乙醇浓度,因此导致酵母细胞死亡的最主要原因可能并不是发酵液中的乙醇浓度过高,而是酵母自身的生命周期。

从表6可以看出,初糖浓度在230g/L以内进行发酵时,酒精发酵效率为88%左右,变化不大。初糖浓度大于260g/L以后,其糖利用率虽然能达到

99%,但是酒精发酵效率却明显开始下降,初糖浓度为320g/L时,酒精发酵效率只达到78.41%,与低浓度糖(50~230g/L)酒精发酵产率88%相差近10个百分点,糖利用率却也能达到98.41%,这说明发酵过程中该酵母可能产生了其他代谢产物。

3 结论与讨论

本文以酒曲为研究对象,从中分离出一株产酒精能力强的酵母菌,探索了不同糖浓度对乙醇发酵过程中该酵母的生长和发酵产酒精能力的抑制作用,确定了糖浓度对酵母菌性能的临界浓度值。

通过测出发酵过程中糖浓度、酒精浓度和细胞浓度的变化曲线,可以较快筛选出高产酒精的酵母菌。筛选得到的5-1Y菌株的最佳初糖发酵浓度为230g/L,乙醇发酵效率为88.35%,糖利用率为99.9%,当继续提高糖浓度大于临界值260g/L后,由于受到糖浓度的显著抑制作用,虽然乙醇浓度有所提升,但发酵效率降低,糖利用率仍能达到99.8%~99.9%,继续提高葡萄糖浓度对于酒精发酵无实际意义。

发酵产物乙醇对酵母的生长和发酵能力有明显的抑制作用,如何降低乙醇对酵母菌的毒害作用和筛选出耐高浓度乙醇酵母是提高乙醇产量的关键。

不同的酵母产生的代谢产物不同,在发酵过程中产生的挥发性物质也是有所差异的^[17-19]。将本实验选出的一株酿酒酵母初步用于酿造米酒时,酿出的米酒酒味纯正、邪味少,是一株具有酿酒潜力的高产酒精酵母。其酿造工艺还在进一步研究中。

参考文献

- [1] 张中义, 畅晓霞, 钟其顶. 酒曲酶系、菌系特征及酿造过程中微生物动态变化[J]. 酿酒, 2008, 35(5): 24-28.
- [2] 惠丰立, 柯涛, 褚学英, 等. 大曲中酵母菌群结构及多样性分析[J]. 食品与生物技术学报, 2009, 28(1): 102-106.
- [3] 高玉妹, 陶能国, 刘跃进, 等. 白酒酒曲中9株酵母菌的分离与特性研究[J]. 食品工业科技, 2010(5): 195-201.
- [4] 李纪亮. 孝感米酒感官品评体系的建立[J]. 酿酒, 2003, 30(6): 93-96.
- [5] 巴尼特 J A, 佩斯 R W, 亚罗 D. 酵母菌的特征与鉴定手册[M]. 青岛: 青岛海洋大学出版社, 1991: 18-31.

(下转第166页)

