

# 酒曲中产酯酵母的分离筛选

万世旅<sup>1,2</sup>, 李光辉<sup>1,2</sup>, 钟姝霞<sup>1,2</sup>, 边名鸿<sup>1,2</sup>

(1. 四川理工学院生物工程学院, 四川 自贡 643000; 2. 酿酒生物技术及应用四川省重点实验室, 四川 自贡 643000)

**摘 要:**从川西南不同区域的酒曲中分离纯化出 18 株产酯酵母菌株,通过测量透明圈直径初筛、发酵产酯能力和四大酯催化生成能力复筛获得优良的产酯酵母,并考察其对酒精、温度和酸度的耐受性。结果表明:酵母 Y2 的产酯能力最好,其在高粱发酵培养基中总酯产量为 3.273 g/L,在 100 mL 的酯化体系中催化生成乙酸乙酯和己酸乙酯的量为 2.731 g/L 和 1.921 g/L,该菌株能够在酒精浓度 10%、pH2.0、温度为 38 ℃ 的条件下生长,具有良好的耐酒精、耐酸和耐高温能力。

**关键词:**酒曲;产酯酵母;耐受性

**中图分类号:**TS261.1<sup>+</sup>1

**文献标志码:**A

## 引 言

产酯酵母又称生香酵母,是可生成较多酯类物质的酵母通称,分属于汉逊酵母属、产朊酵母属、假丝酵母属、球拟酵母属和酒香酵母属等,是中国白酒中酯香的主要产生菌。产酯酵母主产乙酸酯类,特别是乙酸乙酯<sup>[1-3]</sup>。

小曲酒是我国白酒的主要酒种之一,在四川、贵州、云南、江西、湖北和湖南等省有广泛的分布。随着小曲白酒生产工艺技术的改革和科研的进步,小曲酒的质量有了一定提高,但仍普遍存在放香不足等问题<sup>[4]</sup>。乙酸乙酯作为小曲白酒的主体香味成分,其含量对于小曲酒的质量有着重要影响,因此,筛选产乙酸乙酯能力强,产酯丰富并且适合小曲酒生产的酵母,可以为小曲的制曲提供优良的菌种,提高小曲质量,改善小曲酒酒质,促进小曲酒的发展,同时提高小曲酒生产企业的经济效益和市场竞争能力<sup>[5]</sup>。

传统酒曲中含有大量酿酒有益微生物,包括优良糖化菌、酵母菌等,本文从优质酿造酒曲中筛选产酯酵母,

并以高粱酶解液作为培养基研究其产酯情况,以期获得适于小曲酒酿造的优良产酯酵母。

## 1 材料与amp;方法

### 1.1 试验材料

#### 1.1.1 样品及菌种来源

样品:8 种来源于川西南片区不同区域的酿造酒曲,其中,5 种大曲,3 种小曲。

对比菌株:产酯酵母 *Nj*sys - *SYT* 由实验室分离培养并保存。

#### 1.1.2 主要试剂

氢氧化钠、醋酸钠、氯化钾、硫酸、无水乙醇、酚酞、氯化钠、葡萄糖、琼脂粉(分析纯,成都科龙化工);糖化酶、淀粉酶、蛋白胨、酵母浸膏(北京奥博星生物技术有限责任公司);三丁酸甘油酯(阿拉丁试剂(上海)有限公司);链霉素、青霉素、土豆、高粱(市售)。

#### 1.1.3 培养基

产香初筛培养基:马铃薯 20%,蔗糖 2%,琼脂 2%,三丁酸甘油酯 0.4%,pH 自然(涂布时培养基中加入

收稿日期:2015-09-28

基金项目:酿酒生物技术及应用四川省重点实验室基金项目(NJ2013-03)

作者简介:万世旅(1990-),男,四川简阳人,硕士生,主要从事发酵工程方面的研究,(E-mail) 934005033@qq.com;

边名鸿(1979-),女,四川彭州人,副教授,主要从事发酵工程方面的研究,(E-mail) edge\_214@163.com

60 mg/L的青霉素抑制细菌生长,在温度 40 ℃左右时,添加摇匀)。

菌种活化培养基:葡萄糖 2%,酵母膏 1%,蛋白胨 2%,pH 自然。

发酵产酯培养基<sup>[6]</sup>:取 150 g 高粱粉于 2 L 烧杯中,加入少量自来水,搅成糊状,再加热水 600 mL,搅匀,调 pH 值为 6.0~6.5,加入  $\alpha$ -淀粉酶和糖化酶经液化和糖化后取上清液将其糖度调到 8°Bx 备用。

#### 1.1.4 主要仪器

E100 生物显微成像系统(日本 NIKON 公司),UV-200 紫外可见分光光度计(上海尤尼柯有限公司),PHJ-02 型 pH 计(上海精密科学仪器有限公司),BS-2F 数控恒温摇床培养箱(常州精成国华仪器有限公司),MJ-250 生化培养箱(上海齐欣科学仪器有限公司)。

### 1.2 试验方法

#### 1.2.1 酵母的分离纯化

称取 5 g 酒曲样品,加入装有 45 mL 无菌生理盐水的三角瓶中,150 r/min 振荡 30min,充分摇匀。取 5 mL 上清液加入 45 mL 麦氏培养液三角瓶中 30 ℃摇床富集培养 24 h,经梯度稀释后涂布,依次挑取有透明圈的单菌落,经多次平板划线纯化后,通过显微镜观察是否为纯种菌落,将纯菌种移入试管斜面,冰箱内保存备用;不纯的继续分离划线,直至纯化为止。

#### 1.2.2 产酯酵母初筛

将从曲样中分离得到的产酯酵母菌和对比菌株 *Njsys-SYT* 采用点种的方式接种到产香初筛培养基上,30 ℃培养 48 h,每株菌设计 3 个平行对照组,测量菌落直径  $d$ ,透明圈直径  $D$ ,计算  $D/d$  值,选择  $D/d$  值较大的作为复筛出发菌株。

#### 1.2.3 产酯酵母复筛

对复筛菌株进行活化,接种在液体活化培养基中,摇床培养 24 h 后,将细胞数稀释到  $10^8$  个/mL,按 10% 的量接种于装有 100 mL 发酵产酯培养基的三角瓶中,28 ℃恒温静置培养 4 d,每株菌设计 3 个平行对照组,检测总酯含量,总酯的测定采用皂化回流法<sup>[7]</sup>。同时将这几株菌制作成纯种酵母曲测定其对四大酯催化生产能力:称取相当于 5 g 干曲的曲量加入 100 mL 含 1% 相应有机酸和 20% 乙醇的酯化体系中 32 ℃酯化 100 h,加水 50 mL 蒸馏,接溜出液 100 mL 测定相应酯含量<sup>[8]</sup>。

#### 1.2.4 产酯酵母的耐受性研究

耐酒精试验:在酒精浓度为 0%,6%,8%,10%,12%,14% 的 YEPD 液体培养基中接入菌种,120 rpm 摇床培养 24 h 后测定 600 nm 波长下的吸光值,浓度大的

菌液可以作适当稀释,使其测得 OD 值在 0.10~0.80 以内,经稀释后测得的 OD 值乘以稀释倍数,即为培养液实际的 OD 值<sup>[9]</sup>。

耐热试验:分别将接有菌种的培养基置于 30 ℃、34 ℃、36 ℃、38 ℃和 40 ℃下 120 rpm 振荡培养 24 h 后,测定 600 nm 波长下的 OD 值。

耐酸性试验:用盐酸调节培养基 pH 为 2.0、3.0、4.0、5.0、6.0,接入酵母菌悬液,30 ℃、120 rpm 摇床培养 24 h 后,测定 600 nm 波长下的 OD 值。

## 2 结果与分析

### 2.1 酵母的分离纯化

采用传统分离手段对酒曲中酵母菌进行分离,将富集后的酒曲菌悬液经过涂布、划线后共分离出 31 株酵母菌株,其中有透明圈的产酯酵母有 18 株,菌落大多呈乳白色,表面较湿润粗糙,中央平坦边缘整齐,细胞多呈圆形。透明圈明显的代表性菌株如图 1 所示。

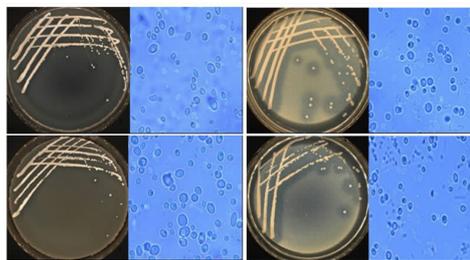


图1 部分菌落与菌体形态

### 2.2 产酯酵母的初筛

将从曲样中分离得到的 18 株产酯酵母及对比菌株 *Njsys-SYT* 接入产香初筛培养基上。通过测量酵母菌落直径  $d$ 、透明圈直径  $D$ ,计算其比值  $D/d$ ,通过  $D/d$  值的大小来表征酵母菌酯化酶活力的高低,结果如图 2 所示。

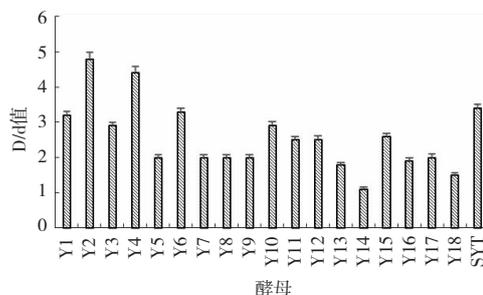


图2 初筛酵母 D/d 值比较

对比菌株 *Njsys-SYT* 是实验室保存的一株优良产酯酵母菌,因此考虑以 *Njsys-SYT* 为参考,选择  $D/d \geq 3.0$  作为复筛条件,由图 2 可知, Y1、Y2、Y4 及 Y6 的  $D/d$  值均大于 3.0,因此选择这 4 株菌作为复筛出发菌

株,进一步研究其产酯化酶能力。

### 2.3 产酯酵母的复筛

将 Y1、Y2、Y4、Y6 及 *Njsys*-SYT 5 株菌株进行发酵,测定其总酯含量,并将其制作成纯种酵母曲考察其对己酸乙酯、乙酸乙酯、乳酸乙酯、丁酸乙酯的催化生成能力。结果分别如图 3 和图 4 所示。

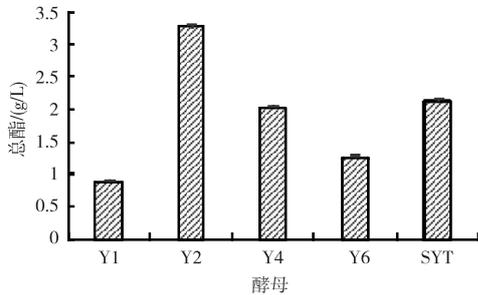


图3 复筛酵母的产总酯结果比较

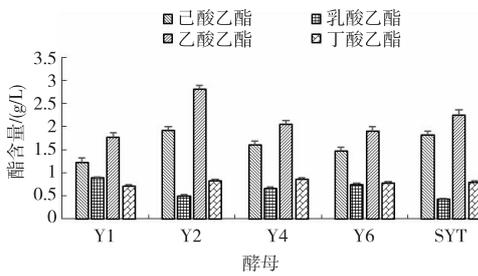


图4 复筛酵母的四大酯催化生成能力比较

从图 3 中可知,在相同的条件下,酵母 Y2、Y4 和 *Njsys*-SYT 产酯效果较好,其中酵母 Y2 产酯能力突出,发酵液中总酯含量达到 3.273 g/L,酵母 Y4 和 *Njsys*-SYT 的发酵液中总酯含量分别也达到 2.042 g/L 和 2.129 g/L。

由图 4 可知,5 株酵母均对乙酸乙酯有很高的催化生产能力,其次是己酸乙酯,其中酵母 Y2 对这两种酯的催化能力最强,其催化生成乙酸乙酯和己酸乙酯的量达到 2.731 g/L 和 1.921 g/L;5 株酵母对己酸的催化能力高于对乳酸的催化能力,这与产酯酵母有升己酸乙酯,降乳酸乙酯作用的研究报道相符<sup>[10]</sup>。综上分析,酵母 Y2 在液态和固态发酵下都有较强的酯化能力,可作为一株优良的产酯酵母。

### 2.4 产酯酵母生长特性研究

小曲酒酿造环境(高酒精浓度、低 pH 及高温)对产酯酵母影响较大,因此需要研究产酯酵母在不同条件的生长情况,以考察菌种对酒精、温度及酸度的耐受性。

#### 2.4.1 酒精浓度对菌株生长的影响

将酵母菌悬液接种于酒精含量分别为 0%、6%、8%、10%、12%、14% 的 YEPD 液体培养基中 30 °C 培养

24 h 后,测定其在 600 nm 的菌体浓度,结果如图 5 所示。

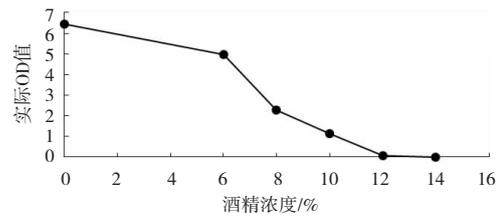


图5 不同酒精含量下 Y2 菌株的生长情况

由图 5 可以看出菌株的生长随着酒精浓度的升高而受到严重影响。菌株 Y2 能耐受 10% 的酒精环境,有较高的耐酒精能力,这样在白酒发酵后期,酒精的积累对菌株 Y2 的影响相对会较小,有利于香味物质的合成。

#### 2.4.2 耐热性试验

将酵母菌悬液接种于 YEPD 液体培养基中,分别置于 30 °C、34 °C、36 °C、38 °C、40 °C 下 120 rpm 振荡培养 24 h 后,测定其在 600 nm 波长下的菌体浓度,结果如图 6 所示。

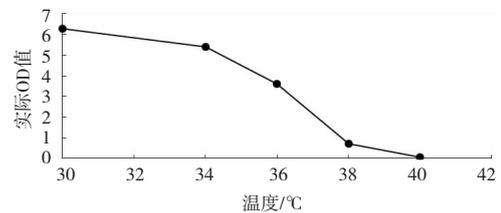


图6 不同温度下 Y2 菌株的生长情况

小曲白酒因为发酵周期短,因此在发酵过程中升温幅度较大。耐高温的产香微生物有利于代谢产物的积累,同时,温度影响微生物细胞内生物大分子(如蛋白质和核酸)的稳定性、细胞膜的流动性等方面<sup>[11]</sup>,温度变化能够导致细胞膜破坏、代谢活动减弱,影响细胞生长。由图 6 可知,菌株 Y2 在 38 °C 仍有一定的生长,有较强的耐热性。

#### 2.4.3 耐酸性试验

将酵母菌悬液接种于 pH 值分别为 2.0、3.0、4.0、5.0、6.0 的 YEPD 液体培养基中 30 °C 培养 24 h 后,测定其在 600 nm 的菌体浓度,结果如图 7 所示。

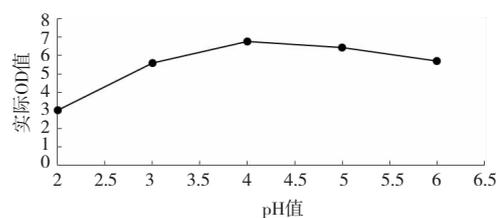


图7 不同 pH 条件下 Y2 菌株的生长情况

小曲酒发酵周期短,产酸快,酿酒过程 pH 值较低,因此对微生物耐酸性要求很高。同时 pH 值变化能使微生物细胞中的电解质发生变化,从而影响微生物的生长代谢<sup>[12]</sup>。由图 7 可知,Y2 酵母菌株在 pH 值为 2 的情况下生长依然旺盛,可见该菌株耐酸性能很好。

### 3 结束语

本文从不同酒曲样品中分离纯化出有产酯能力的酵母菌 18 株,通过初筛、复筛,得到一株产乙酸乙酯能力较强的酵母 Y2,其在高粱糖化液中总酯产量为 3.273 g/L,在 100 mL 的酯化体系中催化生成乙酸乙酯和己酸乙酯的量为 2.731 g/L 和 1.921 g/L。该酵母菌能在酒精浓度 10%、pH2.0、温度为 38 °C 的条件下生长,具有良好的耐酒精、耐酸和耐热能力,是一株优良的产香酵母,在改善小曲酒风味及稳定酒的质量有较好的应用前景。

#### 参考文献:

- [1] 徐安静,唐清兰,刘孟华,等.剑南春酒曲中生香酵母菌株的选育[J].酿酒,2012(3):11-14.
- [2] 沈怡方.白酒生产技术全书[M].北京:中国轻工业出版社,1998.
- [3] 胡沂淮,贾亚伟,戴源,等.生香酵母 Yeast-1 产香物质的 GC-MS 分析[J].酿酒科技,2013(6):21-24.
- [4] 李一川.高质量小曲白酒的研究[D].武汉:湖北大学,2014.
- [5] 吴赫川,马莹莹,杨建刚.川法小曲白酒发展现状及其瓶颈问题分析[J].安徽农业科学,2014,42(33):11850-11853.
- [6] 董士伟.豉香型白酒中功能微生物的筛选与应用[D].郑州:河南工业大学,2012.
- [7] 王福荣.酿酒分析与检测[M].北京:化学工业出版社,2012.
- [8] 蒲春,胡沂淮,贾亚伟,等.产酯酵母的筛选及其发酵特性研究[J].酿酒科技,2013(3):47-49,53.
- [9] 彭源德,朱作华,唐守伟.耐高温、高浓度酒精酵母的选育与耐受性能初步鉴定[J].中国麻业科学,2010(3):135-139,142.
- [10] 施安辉,刘积和,曲维祺.当前浓香型白酒增己降乳的微生物学技术[J].中国酿造,2001(3):8-10.
- [11] 张春林.泸州老窖大曲的质量、微生物与香气成分关系[D].无锡:江南大学,2012.
- [12] 兰天晴.固定细胞发酵产纤维素酶及纤维素乙醇的生产应用研究[D].广州:华南理工大学,2013.

## Isolation and Screening of Ester-producing Yeast in Koji

WAN Shilu<sup>1,2</sup>, LI Guanghui<sup>1</sup>, ZHONG Shuxia<sup>1,2</sup>, BIAN Minghong<sup>1,2</sup>

(1. School of Biotechnology Engineering, Sichuan University of Science & Engineering, Zigong 643000, China;

2. Liquor Making Bio-Technology & Application of Key Laboratory of Sichuan Province, Zigong 643000, China)

**Abstract:** 18 strains of ester producing yeast were separated and purified in liquor making koji from the different zones of southwest of Sichuan, and an excellent ester-producing yeast strain was screened through the transparent circle diameter measuring and ability of ester-producing fermentation and catalytic production of four kinds of esters. Its tolerance to alcohol, temperature and acidity were studied. The results showed that ability of ester producing of yeast strain Y2 was the highest. Its total ester yield in the sorghum fermentation medium was 3.273g/L, and the catalytic production yield of ethyl acetate and ethyl hexanoate were 2.731g/L and 1.921g/L in 100mL esterification system. The yeast strain with good tolerance to alcohol, acid and heat could be grown under the conditions of alcohol concentration 10%, pH2.0, temperature 38°C.

**Key words:** koji; ester-producing yeast; tolerance