

浓香型大曲中一株酵母菌的分离鉴定及其挥发性产物分析

祝云飞, 黄治国, 邓杰, 钟姝霞, 李永博, 汪文鹏

(酿酒生物技术及应用四川省重点实验室, 四川 自贡 643000)

摘要:大曲是酒醅中酵母菌的重要来源,酵母菌对产酒、产酯、生香等都有相应的影响。研究大曲中的酵母菌对指导大曲生产、稳定大曲质量、提升白酒品质具有重要意义和价值。试验采用传统平板分离法从浓香型大曲中分离得到一株酵母菌,先通过形态特征观察并利用 Biolog 微生物鉴定系统进行鉴定,然后对其固态发酵代谢的挥发性产物进行 GC-MS 分析。结果表明,该菌株为依哈塔假丝酵母(*Candida shehatae*),其挥发性产物主要为乙醇、异戊醇和苯乙醇等醇类,并含有多种其他香味物质如异戊酸、苯乙醛、辛酸乙酯等。揭示了浓香型大曲中存在依哈塔假丝酵母,其主要作用为发酵产酒和产香味物质。

关键词:大曲;酵母菌;Biolog 鉴定;挥发性产物;GC-MS

中图分类号:TS261.1⁺1

文献标志码:A

引言

中国白酒在全球各类蒸馏酒中独树一帜,它的生产基于一种“多菌共酵”的体系,各种微生物之间相互影响共同代谢发酵。通过自然富集筛选环境中的微生物而制得的大曲是发酵酒醅中复杂微生物菌群的重要来源,为酒醅提供了多种数量丰富的酵母菌、细菌、霉菌和少量的放线菌,但在大曲酒发酵过程中起主要作用的是酵母菌和专性厌氧或兼性厌氧的细菌^[1],酵母菌对产酒、产酯、生香等方面都有重要影响。

众多专家学者对大曲中的酵母菌进行了广泛而深入的研究,有在传统工艺上进行改进和创新,如添加 HH-AADY(耐高温活性干酵母)强化发酵,提高出酒率^[2-3],但酵母菌群落结构复杂,单纯添加菌种

进行强化发酵对提升酒质帮助较小。很多研究开始对酵母菌群落结构进行剖析^[4-5],然而对微生物资源的开发利用,应从获取纯种开始,故有专家学者先分离获取纯种,再进行鉴定和相关研究^[6-8]。鉴于样品来源、分离培养方法、实验条件、实验操作等的影响与限制,难以分离纯化得到大曲中所有的酵母菌菌株。

本文尝试采用平板划线法从浓香型大曲中分离酵母菌,利用 Biolog 微生物鉴定系统对其进行鉴定,经固态发酵后利用顶空固相微萃取(HS-SPME)法提取其挥发性产物,随后进行 GC-MS 分析。旨在进一步揭示浓香型大曲中酵母菌群落的组成,并分析所得菌株发酵产生的挥发性产物,初探其在白酒酿造中的作用和应用价值。

收稿日期:2015-12-24

基金项目:固态发酵资源利用四川省重点实验室开放基金项目(2015GTY004);四川省教育厅科技成果转化重大培育项目(15CZ0023);自贡市重点科技计划(2014ZC03);四川理工学院人才引进项目(2014RC28;2015RC12)

作者简介:祝云飞(1990-),男,江西抚州人,硕士生,主要从事酿酒生物技术及应用方面的研究,(E-mail)1148733530@qq.com;

黄治国(1978-),男,四川广安人,教授,博士,主要从事生物技术方面的研究,(E-mail)hzgwww@126.com

1 试验材料与方法

1.1 样品

四川全兴酒业有限公司生产的浓香型中高温大曲。

1.2 试剂和设备

0.9%的生理盐水;美蓝试剂;BUY 琼脂培养基、YT 鉴定板、GEN II Microstation Biolog 自动微生物鉴定仪(美国 Biolog 公司);50 μm /30 μm DVAB/CAR/PDMS 固相微萃取头(美国 Supelco 公司);Agilent 6890N - 5975B 气相色谱-质谱联用仪(美国安捷伦公司);超净工作台,显微镜,高压灭菌锅等。

1.3 培养基

PDA 培养基^[9];pH 5.0~6.0。

BUY 培养基(Biolog 专用):BUY 琼脂培养基 6 g,琼脂粉 2~3 g,100 mL 蒸馏水,加热溶解,冷却后调节 pH 至 5.0~6.0,121 $^{\circ}\text{C}$ 灭菌 20 min。

液态种子培养基:20 g 蔗糖,20 g 蛋白胨,10 g 酵母浸出粉,1 L 蒸馏水,加热溶解后分装于 150 mL 三角瓶,121 $^{\circ}\text{C}$ 灭菌 20 min。

固态发酵培养基:30 g 高粱粉加蒸馏水 15 mL,加入 250 mL 三角瓶中搅拌均匀,121 $^{\circ}\text{C}$ 灭菌 20 min。

1.4 实验方法

1.4.1 酵母菌分离与形态学鉴定

采用平板划线法分离菌株^[9]。28 $^{\circ}\text{C}$ 培养 3~5 天,观察菌落形态,并结合美蓝染色、镜检。挑取具有酵母菌形态特征的单菌落,1~2 次纯化后接于斜面,4 $^{\circ}\text{C}$ 保藏。

1.4.2 Biolog 鉴定^[10-13]

菌株活化:将分离所得菌株用 PDA 培养基活化。

BUY 琼脂培养基培养:将活化菌株交叉划线接种,接种面积应适当加宽,以获得足够的菌量。28 $^{\circ}\text{C}$ 培养 48~72 h,培养 2 代,若菌株长势较差可增加接种平板数。

浊度调整与菌悬液制备:先以装有空白无菌水的玻璃管调 100% 透光率,并用 YT 浊度标准管将读数调整至 47%,再在无菌条件下,用灭菌棉签挑取 BUY 培养基上的菌落,接种于无菌水中,使菌体均匀分散,最后通过添加菌体或无菌水调整菌悬液的浊度至 $47 \pm 3\%$ 。

微平板接种、培养与读数:将制备好的菌悬液加入

鉴定板孔内,每孔 100 μL ,然后用塑料袋密封,以保证其湿度;30 $^{\circ}\text{C}$ 恒温培养 24 h、48 h、72 h 后,分别用 Biolog 微生物鉴定系统鉴定,读取并记录数据。

1.4.3 液体培养与固态发酵

液体培养:菌株经平板活化后,挑取少量菌体接种于液体培养基中,28 $^{\circ}\text{C}$,120 rpm,摇床培养 2~3 天。

固态发酵:无菌条件下,吸取 10 mL 液体培养的种子液,加入固态发酵培养基中,密闭瓶口,28 $^{\circ}\text{C}$ 恒温发酵 7 天。

1.4.4 顶空固相微萃取(HS-SPME)

称取 8 g 固态发酵后的培养基加入顶空瓶中,在 60 $^{\circ}\text{C}$ 恒温条件下,先平衡 10 min,再顶空萃取 30 min,随后于 GC-MS 进样口以 200 $^{\circ}\text{C}$ 解吸 3 min。

1.4.5 气相色谱-质谱(GC-MS)分析条件

气相色谱条件:毛细管色谱柱为 J&W 122-7062,规格为 60.0 m \times 250 μm \times 0.25 μm ;手动分流进样,分流比为 15:1;进样口温度 200 $^{\circ}\text{C}$;起始温度:40 $^{\circ}\text{C}$,维持 1 min,然后以 5 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 升温至 150 $^{\circ}\text{C}$,维持 1 min,再以 10 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 升温至 230 $^{\circ}\text{C}$,维持 3 min;以 He 为载气,流速为 1 mL/min。

质谱条件:电离方式 EI,电子能量 70 eV,离子源温度 230 $^{\circ}\text{C}$,四极杆温度 100 $^{\circ}\text{C}$,恒压 10 Pa,全扫描。

2 试验结果分析

2.1 酵母菌的分离与初步鉴定结果

从全兴浓香型中高温大曲中成功分离纯化出一株酵母菌,编号为 J-01,其菌落图及其美蓝染色的镜检结果如图 1 所示。其菌落呈圆形,隆起,乳白色,边缘较整齐,易挑取,粘稠,长时间培养将呈暗黄色,具有酵母菌菌落典型的形态特征,其菌体特征为椭圆形,可见出芽繁殖形成的芽体。

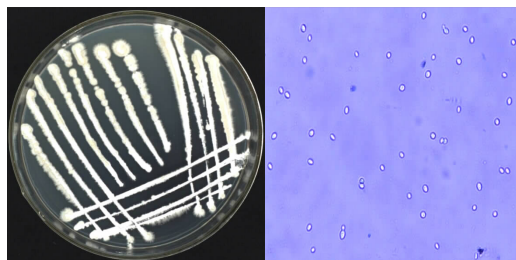


图 1 酵母菌 J-01 菌落与镜检图(40 \times)

2.2 Biolog 鉴定结果

对分离得到的酵母菌 J-01 采用 BUY 培养基十字交叉划线接种,酵母菌 J-01 在 BUY 培养基上,生长十分旺盛,代谢较高,没有其他杂菌存在,满足下一步微平板接种所需要的纯度以及所需的生物量。对 J-01 进行微平板接种并在 30 ℃ 恒温箱中培养,分别在培养 24 h、48 h、72 h 后,对微平板进行 Biolog 读数,培养 48 h 后的鉴定结果见表 1。

表 1 酵母菌 J-01 的鉴定结果

序号	PROB	SIM	DIST	TYPE	NAME
1	0.960	0.853	1.807	YT	<i>Candida shehatae</i>
2	0.115	0.174	4.04	YT	<i>Pichia onychis</i>
3	0.009	0.044	4.50	YT	<i>Endomyces fibuliger</i>

由表 1 可知,系统^[14]给出的最大可能结果是 *Candida shehatae* (休哈塔假丝酵母),其 PROB(可能性)、SIM(相似性)和 DIST(位距)分别为 0.960、0.853、1.807,基本

确定 J-01 为休哈塔假丝酵母。

2.3 挥发性产物分析

以高粱为底物对 J-01 进行固态发酵实验,发酵代谢的挥发性产物采用顶空固相微萃(HS-SPME)法进行提取,然后进行 GC-MS 分析,其总离子流图谱如图 2 所示,经谱库 NIST 检索和资料分析,其结果见表 2。

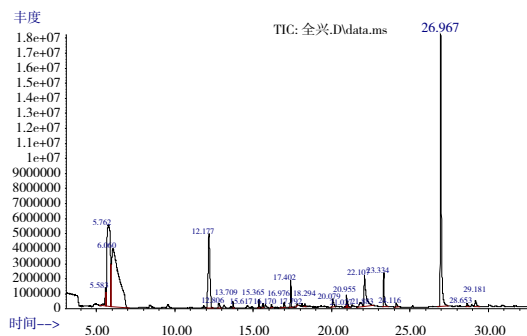


图 2 酵母菌 J-01 挥发性产物总离子流图谱

表 2 酵母菌 J-01 主要挥发性产物

序号	保留时间/min	化合物名称	相似度	相对含量/%
1	5.58	乙醇	86	1.55
2	5.76	乙醇	90	21.31
3	6.06	乙醇	91	31.85
4	12.18	异戊醇	80	10.16
5	12.81	3-辛酮	93	0.50
6	13.71	2,2,7,7-tetramethyl-	64	0.34
7	15.37	正己醇	90	0.41
8	15.62	Octen-1-ol, acetate	90	0.28
9	16.17	3-辛醇	64	0.18
10	16.98	辛酸乙酯	95	0.45
11	17.40	1-辛烯-3-醇	86	1.36
12	17.79	乙酸	90	0.11
13	18.29	2-巯基-4-苯基噻唑	38	0.16
14	20.08	异丁酸	87	0.66
15	20.96	2-癸烯-1-醇乙酸酯	72	0.51
16	21.03	反式-2-壬烯-1-醇	72	0.41
17	21.88	苯乙醛	94	0.81
18	22.10	异戊酸	87	4.55
19	23.33	Oxime-, methoxy-phenyl-	78	2.02
20	24.12	六甲基环三硅氧烷	53	0.41
21	26.97	苯乙醇	94	21.10
22	28.65	4-乙基-2-甲氧基苯酚	81	0.25
23	29.18	甲瓦龙酸内酯	87	0.66

由表2可知,J-01 固态发酵的主要挥发性产物为乙醇、异戊醇和苯乙醇,相对含量分别为 54.71%、21.10% 和 10.16%。乙醇是白酒的主体成分,乙醇相对含量高表明酵母菌 J-01 具有较好的酒精发酵能力,可提高原料利用率。苯乙醇是我国规定允许使用的食用香精,是白酒重要的风味成分,是米香型白酒的主体香味成分之一。异戊醇可以用作香精、分析试剂、制药等,在白酒中可以增加酒体的醇甜感,让酒体更丰满。

酵母菌 J-01 代谢的挥发性产物中还有其他多种香味物质,如异戊酸(相对含量 4.55%),可用于制备香料,高度稀释后则有甜润的果香以及笃斯越橘的香味;苯乙醛(相对含量 0.81%)具有类似风信子的香味,稀释后具有水果的甜香气;1-辛烯-3-醇(相对含量 1.36%),又名蘑菇醇,具有蘑菇、薰衣草、玫瑰和干草香味;辛酸乙酯(相对含量 0.45%),具有白兰地酒香味;3-辛醇(相对含量 0.18%),其具有强烈的油脂、果仁和草药香味,稀释后呈蘑菇香气和干酪香味,在白酒中作为香味物质。

3 讨论

本文利用 Biolog 微生物自动鉴定系统,对分离得到的酵母菌 J-01 进行鉴定,首次报道浓香型大曲酵母菌群落中存在休哈塔假丝酵母(*Candida shehatae*)。相比于传统基于形态和生理生化特征的微生物鉴定方法,Biolog 鉴定法在鉴定速度和准确性方面有一定的优势,后续可以进行分子生物学鉴定,以相互验证,并分析该菌种的进化关系。

在分离筛选的过程中,发现在 pH 为 5.0~6.0 时筛选效果最好,酵母菌可以正常快速地生长,霉菌和细菌得到了一定程度的抑制,表明该菌株对酸性环境具有一定的耐受性,能够适应固态发酵酒醅中低 pH 条件而在酒醅中有更长的存活和发酵代谢时间,可进一步的研究。

GC-MS 分析结果表明,休哈塔假丝酵母除最主要的挥发性产物为乙醇外,还有其他醇类、醛类、酸类等香味成分,因而休哈塔假丝酵母在白酒酿造中的作用可能体现在产酒和生香两方面。休哈塔假丝酵母是能够直接利用木糖发酵产乙醇的少数天然菌种之一,在利用休哈塔假丝酵母发酵农作物废弃物生产乙醇方面已有相

关的文献报道^[15-16],而酿酒酵母不能利用木糖进行发酵,因此在酒醅添加休哈塔假丝酵母强化发酵对提高酒率和提升酒质可能都有一定的帮助。

大曲中酵母菌群落结构复杂,且受不同地区地域环境的影响,其群落结构也将呈现出一定的差异,对大曲酵母菌菌群进行研究,保障大曲质量,提升白酒品质,仍需大量的研究工作。

参考文献:

- [1] 肖光冬.白酒生产技术[M].北京:化学工业出版社,2005.
- [2] 戴森,樊林,陈周平,等.TH-AADY 在泸型酒中生产名优酒的研究[J].酿酒科技,1998(2):32-35.
- [3] 徐希望,苏循亮,张彬.TH-AADY 在浓香型大曲酒秋季转排生产中的应用[J].酿酒科技,2005(9):95-100.
- [4] 惠丰立,柯涛,褚学英,等.大曲中酵母菌种群结构及多样性分析[J].食品与生物技术学报,2009,28(1):107-111.
- [5] 徐占成,唐清兰,刘孟华,等.剑南春大曲曲药真菌群落结构的分析[J].酿酒,2015,42(4):19-22.
- [6] 赖颖,赵锦慧,胡炳义,等.中高温大曲中耐高温酵母菌的筛选及其发酵特性的研究[J].酿酒科技,2014(11):42-45.
- [7] 明红梅,董瑞丽,许德富,等.浓香型大曲中优势菌的分离及初步鉴定[J].酿酒科技,2013(12):63-66.
- [8] 张磊,施思,张文学,等.浓香型白酒大曲中酵母菌的分离和鉴定[J].酿酒科技,2010(5):30-32.
- [9] 周德庆.微生物学实验教程[M].2版.北京:高等教育出版社,2006.
- [10] 孙莹,季方,周维军,等.Biolog 微生物自动鉴定系统对 2 株大曲菌种的鉴定[J].酿酒,2013,40(3):73-75.
- [11] 卫春会,杨晓东,黄治国,等.浓香型大曲中两株酵母菌的分离及其 Biolog 微生物鉴定[J].酿酒科技,2013(4):31-32,36.
- [12] 刘宏媛,李光辉,罗惠波,等.大曲中酵母菌的分离及 Biolog 微生物系统分析鉴定[J].食品与发酵科技,2011,47(1):1-3,22.
- [13] 聂凌鸿,樊璐,季方.大曲中细菌和酵母菌的分离及

- 其 Biolog 微生物系统分析鉴定[J].安徽农业科学, 2012,40(2):1036-1038,1122.
- [14] 姚粟,程池,李金霞,等. Biolog 微生物自动分析系统_酵母菌鉴定操作规程的研究[J].食品与发酵工业, 2006,32(7):67-71.
- [15] 夏黎明,余世袁,丁红卫. 固定化休哈塔假丝酵母细胞发酵玉米秆水解液的研究[J].林产化学与工业, 1994(14):51-55.
- [16] 葛蔷萍,刘国明,杨晓峰,等. 休哈塔假丝酵母 HDYXHT-01 利用木糖生产乙醇的发酵工艺优化[J].生物工程学报,2011,27(3):404-411.

Isolation and Identification of One Yeast Strain from Nong-flavor Daqu and Analysis of Its Volatile Products

ZHU Yunfei, HUANG Zhiguo, DENG Jie, ZHONG Shuxia, LI Yongbo, WANG Wenpeng
(Liquor-making Biotechnology & Application key Laboratory of Sichuan Province, Zigong 643000, China)

Abstract: Daqu is an important source of yeast in fermented grains, and the yeast has a corresponding effect on the produce of alcohol, esters and flavor component. Research of yeast in Daqu has an important meaning and value to guide Daqu production and stable the quality of Daqu, and improve the quality of liquor. The test of a yeast strain was isolated from Nong-flavor Daqu through traditional plate separation method. Firstly through the observation of morphological characteristics, and using Biolog microbial identification system to identify, then the volatile products of solid-state fermentation was analysed by GC-MS. The results showed that the strain was *Candida shehatae*, the main component of its volatile products were ethanol, isoamyl alcohol and phenethyl alcohol, and it also contained other kinds of flavor substances such as isovaleric acid, hyacinthin and ethyl caprylate. The study revealed the existence of *Candida shehatae* in nong-flavor Daqu, and its main function is to produce alcohol and flavor component.

Key words: Daqu; yeast strain; Biolog identification; volatile products; GC-MS