

葡萄酒中酒类酒球菌的分离^{*}

——抑制剂对酵母菌生长的抑制效应

张春晖¹ 李 华¹ 张军翔²

1(西北农林科技大学葡萄酒学院,杨凌,712100)

2(宁夏农学院园林系,永宁,750105)

摘 要 从葡萄酒中分离酒类酒球菌时,酵母菌是最主要的干扰菌。作者通过在 ATB 和改良 MRS 琼脂培养基中添加放线菌酮、山梨酸和制霉菌素,研究了不同抑制剂对酵母生长的抑制效应。结果表明,采用 ATB+50 mg/L 放线菌酮、改良 MRS+50 mg/L 放线菌酮、改良 MRS+100 mg/L 山梨酸、改良 MRS+50 mg/L 制霉菌素选择性培养基,能够完全抑制酿酒酵母的生长。

关键词 酒类酒球菌,分离,酵母,放线菌酮,山梨酸,制霉菌素

酒类酒球菌(*Oenococcus oeni*)是进行葡萄酒苹果酸-乳酸发酵(malolactic fermentation, MLF)最为主要的乳酸菌。MLF 是葡萄酒中的苹果酸(二元酸)在乳酸菌的作用下转变成乳酸(一元酸)的过程,二元酸向一元酸的转变使葡萄酒的酸度降低,目前 MLF 已经广泛地用于葡萄酒的生物降酸^[1]。此外 MLF 还能增加葡萄酒的风味复杂性和微生物稳定性,是酿造优质红葡萄酒必要工艺^[2]。

葡萄酒发达国家如法国、美国、意大利、南非等国都是采用接种发酵(而不是自然发酵)进行 MLF,而且通过对葡萄酒中自然优良酒类酒球菌的分离,产生商业发酵剂。由于酒类酒球菌为兼性厌氧菌,在有氧条件下平板分离培养,不能形成菌落,因此必须进行厌氧培养,酒类酒球菌生长缓慢,通常需要 5~7 d 才能形成菌落,而且菌落较小,故分离培养需要较高的条件。在酒类酒球菌分离操作中,葡萄酒中常常有酵母和霉菌的存在。由于进行厌氧培养分离,故能有效地抑制霉菌的生长,但酵母却能够在厌氧条件下生长

并形成菌落,因此酵母菌是最主要的干扰微生物^[3]。本文探讨了几种酵母抑制剂的作用效果及其对酒类酒球菌生长的影响,为酒类酒球菌分离培养基的设计提供依据。

1 材料与方法

1.1 供试菌株

酒类酒球菌 31DH(*Oenococcus oeni* 31DH, 以前称酒明串珠菌 31DH, *Leuconostoc oenos* 31DH),由中国食品发酵工业研究所提供;酿酒酵母 1450(*Saccharomyces cerevisiae* 1450)由西北农林科技大学葡萄酒学院保存。

1.2 培养基

ATB 培养基(1 L):蛋白胨 10 g,酵母浸出物 5 g,葡萄糖 10 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.2 g, $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0.05 g,盐酸半胱氨酸 0.5 g,番茄汁 250 mL。1 mol/L HCL 或 NaOH 调 pH 至 4.8。

改良 MRS 培养基(1 L):酵母浸出物 5 g,牛肉膏 10 g,胰蛋白胨 15 g,乙酸钠 5 g,柠檬酸铵 2 g, $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0.05 g, $\text{MgSO}_4 \cdot$

第一作者:博士。

^{*} 宁夏自然科学基金资助项目(No. 200015)

收稿日期 2002-01-28, 改回时间 2002-05-28

7H₂O 0.2 g, 葡萄糖 20 g, Tween80 1 mL, 番茄汁 100 mL。1 mol/L HCL 或 NaOH 调 pH 至 4.8。

配制固体培养基时添加 1.2%(质量比)的琼脂粉。

1.3 接种

采用 ATB 液体培养基分别对 *Oenococcus oeni* 31DH 和 *S. cerevisiae* 1450 进行静置培养, 达对数生长期后, 经梯度稀释, 分别涂布接种在 ATB 和改良 MRS 固体培养基上。

1.4 培养

在 28℃、厌氧条件下(充 N₂)培养 7 d 后观测菌落形成情况, 对菌落计数, 并换算成菌落形成单位。每个培养试验均重复 3 次, 结果取平均值。

1.5 主要试剂与仪器

制霉菌素(nystatin)购于 Amresco 公司, 使用前采用孔径为 0.2 μm 的滤纸过滤除菌; 环己酰亚胺(actidione)购于 Fluka 公司, 山梨酸和其他培养基成分为国产分析纯试剂。

主要仪器有高压灭菌锅、厌氧培养箱、超净工作台等。

2 结果与分析

2.1 放线菌酮对酵母菌的抑制作用

放线菌酮又称环己酰亚胺, 能抑制大多数种的酵母菌的生长, 其作用机理是抑制酵母菌蛋白质的合成^[4]。放线菌酮除了能够抑

制酵母生长外, 还对有些霉菌如黑曲霉(*Aspergillus niger*)、根霉(*Rhizopus*)具有抑制作用。因此, 在微生物分离培养基中, 放线菌酮是常用的酵母抑制剂^[5]。表 1 表明, 在厌氧条件下, 培养基中未添加放线菌酮的情况下, *S. cerevisiae* 1450 可以在改良 MRS 和 ATB 琼脂培养基上生长; 当培养基中添加 10 mg/L 的放线菌酮时, 酵母菌几乎不生长(只形成 0~2.5 个菌落); 当培养基中添加 50 mg/L 的放线菌酮时, 在 2 种培养基上酵母菌均不生长。将 *S. cerevisiae* 1450 与 *O. oeni* 31DH 混合接种到含 50 mg/L 放线菌酮的 ATB 培养基上时, 无酵母菌落形成(图 1)。而在培养基中添加 10~50 mg/L 的放线菌酮时, 对 *O. oeni* 31DH 的生长没有影响(表 1)。

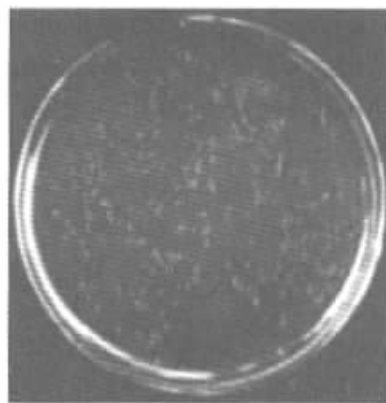


图 1 含 50 mg/L 放线菌酮的 ATB 培养基上无酵母菌落的形成

表 1 不同质量浓度放线菌酮对酿酒酵母的抑制效果比较

培养基	放线菌酮 /mg·L ⁻¹	菌落数/cfu·mL ⁻¹		菌落培养时间 /d	<i>O. oeni</i> 菌落直径 /mm
		<i>S. cerevisiae</i> 1450	<i>O. oeni</i> 31DH		
改良 MRS	0	290.5	487.3	7.0	≤1.0
	10	2.5	460.0	7.0	≤1.0
	50	0.0	501.0	7.0	≤1.0
	70	0.0	510.5	7.0	≤1.0
ATB	0	174.5	486.7	6.0	≈1.0
	10	2.0	476.0	6.0	≈1.0
	50	0.0	439.0	6.0	≈1.0
	70	0.0	509.5	6.0	≈1.0

2.2 山梨酸对酵母菌的抑制作用

在酸性条件下,山梨酸可以用于抑制酵母菌、霉菌、好气性细菌等微生物的生长,但在一定的浓度范围内,对兼性厌氧的酒球菌属的细菌的生长没有影响^[5]。在改良 MRS 和 ATB 培养基中,添加不同质量浓度的山梨酸(50 ~ 500 mg/L)进行酵母抑制实验(表 2),结果表明,在改良 MRS 培养基上,100 mg/L 的山梨酸可以完全抑制酵母菌的生长,而在 ATB 培养基上,500 mg/L 的山梨酸仍不能完全抑制酵母菌生长。由此可见,山梨酸对酵母菌的抑制效果受培养基成分的影响。将 *S. cerevisiae* 1450 与 *O. oeni* 31DH 混合接种在含 100 mg/L 山梨酸的改良 MRS 培养基上,无酵母菌落形成(图 2)。表 2 结果还表明,山梨酸对酒类酒球菌生长的影响有以下特点:随着山梨酸质量浓度的增加,形

成的酒类酒球菌菌落变小,高质量浓度的山梨酸对细菌的生长有抑制作用。因此,就 ATB 和改良 MRS 培养基而言,应采用在改良 MRS 培养基添加 100 mg/L 的山梨酸为宜。

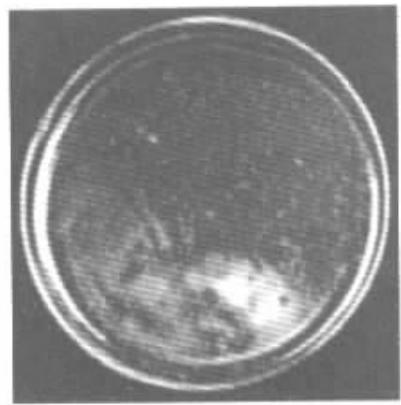


图 2 含 100mg/L 山梨酸的改良 MRS 培养基上无酵母菌落形成

表 2 山梨酸对酒类酒球菌和酵母菌生长的影响

培养基	山梨酸质量浓度 /mg·L ⁻¹	菌落数/cfu·mL ⁻¹		<i>O. oeni</i> 菌落直径 /mm
		<i>S. cerevisiae</i> 1450	<i>O. oeni</i> 31DH	
改良 MRS	50	38.3	93.0	≈1.0
	100	0.0	106.3	≈1.0
	300	0.0	112.7	≈0.5
	500	0.0	81.0	<0.5
ATB	50	46.7	128.7	≈1.0
	100	5.3	103.3	≈1.0
	300	0.3	98.3	≈0.5
	500	0	65.0	<0.5

2.3 制霉菌素对酵母菌的抑制作用

制霉菌素(nystatin)是由诺尔斯尔链霉菌(*Streptomyces noursei*)和金色放线菌(*Actinomyces aureus*)等微生物产生的抗生素,它可以破坏酵母菌的细胞膜,从而抑制酵母菌的生长^[6]。表 3 表明,制霉菌素对酵母菌的抑制效果受培养基成分的影响。在改良 MRS 培养基中,50 mg/L 的制霉菌素可以完全抑制酵母菌的生长,而在 ATB 培养基中,需要 100 mg/L 的制霉菌素才能使其完全受到抑制酵母菌的生长。因此,可以在改良 MRS 培养基中添加 50 mg/L 制霉菌素进行酒类酒球菌的分离。

表 3 制霉菌素对酵母菌和酒类酒球菌生长的影响

培养基	制霉菌素 质量浓度 /mg·L ⁻¹	菌落数/cfu·mL ⁻¹	
		<i>S. cerevisiae</i> 1450	<i>O. oeni</i> 31DH
改良 MRS	50	0.0	360
	100	0.0	245
	150	0.0	172
ATB	50	6.0	487
	100	2.3	413
	150	0.0	183

3 讨论与结论

以上研究表明,放线菌酮、山梨酸和制霉菌素在一定的浓度条件下,都可以完全抑制

酵母菌的生长(表 1、2、3)。因此在分离酒类酒球菌时,都能作为酵母菌抑制剂。不同的抑制剂对酵母菌的抑制效果受培养基成分的影响,例如放线菌酮在 ATB 和改良 MRS 培养基中对酵母的抑制效果没有差别,但在 ATB 培养基上, *O. oeni* 形成的菌落较大;山梨酸和制霉菌素在改良 MRS 培养基中效果较好,但在 ATB 培养基中效果不佳。在选择抑制剂时,还应考虑抑制剂的特点,如制霉菌素虽然对酵母菌也有很强的抑制效果,但却有抑菌谱较为狭窄,价格昂贵,不能高温灭菌等缺点,而放线菌酮和山梨酸不仅对酵母菌有很强的抑制效应,同时还能抑制霉菌的生长,因此在实际工作中最好使用放线菌酮和山梨酸。

综上所述,葡萄酒酒类酒球菌选择性培

养基为:①ATB 或改良 MRS+50 mg/L 放线菌酮;②改良 MRS+100 mg/L 山梨酸;③改良 MRS+50 mg/L 制霉菌素。

参 考 文 献

- 1 张春晖,李 华. 生物工程进展,2001,21(5): 72~74
- 2 张春晖,李 华,夏双梅. 微生物学通报, 1997,2;15~19
- 3 张春晖,王 华,李 华. 西北农业大学学报, 1999,6:92~98
- 4 Sieiro C, Cansado J, Agrelo D et al. Appl. Environ. Microbiol., 1990,56(9):2936~2940
- 5 Benkerroum N, Misbah M, Sandine W E et al. J. Appl. Bacteriol., 1991,71:501~508
- 6 Sliver J, Leighton T. Am. J. Enol. Vitic., 1981,32:64~72

Isolation of *Oenococcus oeni* from Wine

— Inhibition of Yeast

Zhang Chunhui¹ Li Hua¹ Zhang Junxiang²

¹(College of Enology, Northwestern Sci-Tech University of Agriculture & Forestry, Yangling, 712100)

²(Department of Hortiscience, Ningxia Agricultural College, Yongning, 750105)

ABSTRACT In isolation of *Oenococcus oeni* from wine, yeasts often failed the colonies formation of *Oenococcus oeni*, because yeasts grew faster and occupied the whole culture medium surface. In order to suppress yeast growth, the effects of several yeast inhibitors(actidione, sorbic acid and nystatin) were studied and selective media for *Oenococcus oeni* were also designed in this article. ATB or improved MRS media added 50 mg/L actidione, improved MRS medium added 100 mg/L sorbic acid and improved MRS media added 50 mg/L nystatin, which could suppress yeast colony formation entirely.

Key words *Oenococcus oeni*, isolation, yeast, actidione, sorbic acid, nystatin

农业图书信息网在京开通

农业图书信息网集中了农业图书信息:农业类、林业类、生物类、食品类、农业教材类、环保类、化工类等各类图书及音像制品。可光临网站,查询图书、下载目录。

网址: <http://www.agribook.net> 联系电话: 010-62116838 传真: 010-62116838

门市部地址: 北京中关村南大街 12 号 中国农科院幼儿园北门旁

邮购地址: 北京中关村南大街 12 号 中国农科院 266 信箱 邮编: 100081