

山西老陈醋酿酒酵母菌共培养体系的研究

梁丽绒 吕利华 赵良启

(山西大学化学生物学与分子工程教育部重点实验室,太原,030006)

摘 要 通过对山西老陈醋大曲的富集培养,筛选到9株高产乙醇或高产乙酸乙酯的酵母菌功能菌株,分别挑选高产乙醇和乙酸乙酯的酵母菌各1株(经分类鉴定,二者分别为酿酒酵母和异常汉逊酵母)进行共培养试验。通过 $L_{16}(4^5)$ 正交试验选择的最佳共培养条件为:麦芽汁培养基、pH值4.0、33℃、80 r/min摇床培养。应用该共培养物进行了酿酒试验,乙醇和乙酸乙酯产量分别达到体积分数为5.93%和0.02%。以3%的共培养物加入到传统山西老陈醋的酿酒过程中,主要生产指标较传统工艺有显著提高,其乙醇产量提高14%,糖醇转化率提高18.6%,乙酸乙酯的含量提高了1倍。结果表明,通过构建功能菌共培养体系改善大曲微生物的群落结构,提高传统酿造产品的产量与质量是一条可行的途径。

关键词 山西老陈醋,酵母菌,共培养,乙醇,乙酸乙酯

驰名中外的山西老陈醋,品质优良,工艺独特。从微生物学的角度来看,山西老陈醋的酿造过程实质上是一个特定的大曲微生物群体共代谢的过程。经过长期的自然驯化,老陈醋大曲微生物形成了一个彼此共存、顺序生长和代谢互补的特定微生物群落。在这个微生物群落中,含有霉菌、酵母菌、细菌等各类微生物,共同完成着糖化、酒化、醋化和酯化的酿醋过程。在酿醋过程中,酵母菌是产酒与生香的关键功能菌,直接影响酿酒过程,进而影响老陈醋的出品率及其香气、香味成分。

由于受条件影响,常常会造成不同批次老陈醋大曲乃至酿酒过程中酵母菌种类和数量的较大差异,影响老陈醋的品质与出品率。为此,一些厂家在酿酒工序添加纯种酿酒酵母或干酵母,其结果或出酒率提高不明显,或酒醪中酯香成分不足。究其原因,很可能是来自外部体系的酵母菌株与大曲原有的酵母菌体系存在着不相容性。早在1963年,Makower和Bevan就发现一些酵母菌中存在杀菌系统(Killer systems)^[1],通过分泌有毒蛋白杀死其他品系的酵母菌。如果引进的酵母菌被大曲中的某些酵母菌杀死,则达不到增产的目的;如果土著生香酵母菌株被引进的酵母菌所毒杀,则会影响老陈醋的香气、香味成分。因此,应采用合理的科学方法,从老陈醋大曲中筛选酵母功能菌株,再以其优化老陈醋大曲微生物的群落结构,才会有效地提高山西老陈醋的产量与质量。

基于上述考虑,本文旨在从老陈醋大曲中筛选性状优良的土著酿酒、生香酵母菌功能菌株,构建酿酒、

生香酵母菌共培养体系,并探索该共培养体系在老陈醋生产中的应用技术。

1 材料与方法

1.1 材 料

1.1.1 菌 种

老陈醋大曲,由山西老陈醋集团有限公司提供,酵母菌株,本实验室分离保存。

1.1.2 培养基

(1)富集培养基:酵母粉0.5%,葡萄糖20%,蛋白胨1%,调pH至4.0。培养基灭菌后再加入链霉素、青霉素1200单位/mL,孟加拉红0.033 mg/mL,以抑制细菌和霉菌生长。

(2)分离培养基:在富集培养基中加入2%的琼脂。

(3)种子培养基:麦芽汁培养基,pH为4.0。

(4)发酵培养基:将麦芽汁稀释至3~4° Brix,加入葡萄糖使培养液总糖浓度达到25%(以葡萄糖计),pH自然。

1.2 主要仪器设备

GC9800型气相色谱仪、冷冻离心机、恒温摇床及培养箱等。

1.3 实验方法

1.3.1 酵母菌功能菌株的富集及筛选

(1)大曲菌悬液的制备:老陈醋大曲20 g置于100 mL无菌水中,振荡、静置,取上层悬液备用。

(2)富集培养与分离纯化:取上述菌悬液3 mL接种富集培养基,分别置于28、33、37℃下摇床培养(偏心距为3 cm,转速为80 r/min)。48 h后,取富集

第一作者:硕士研究生。

收稿日期:2005-08-12,改回日期:2005-10-09

培养液,稀释、涂布、分离。

(3)筛选功能菌株:将分离所得的酵母菌接种于种子培养基中,置于相应的温度条件下经摇床培养24 h制备种子液。按3%接种量接种于发酵培养基中,23~25℃静置发酵4 d。气相色谱法测定发酵液中的乙醇及乙酸乙酯含量,挑选性状优良的酵母菌功能菌株。

1.3.2 酵母菌功能菌株组合体系的构建及生产性状测试

构建酵母菌株组合体系的方式有2种:1是将乙醇高产菌株和乙酸乙酯高产菌株分别纯培养后,按一定比例混合作为酿酒发酵剂;2是将乙醇高产菌株和乙酸乙酯高产菌株在适宜的条件下共培养,以共生菌液作为酿酒发酵剂。通过酿酒试验,检测菌株组成体系的生产性状。

1.3.2.1 酵母菌功能菌株的纯培养及混合酿酒发酵试验

选择高产乙醇和高产乙酸乙酯的酵母菌各1株,分别接种于种子培养基中,依照筛选条件制备种子液,镜检、细胞计数后以4:6:6:4和8:2的细胞数量比混合2种酵母菌种子液,按接种量3%将混合酵母菌种子液接入发酵培养基,23~25℃静置发酵4 d,测定发酵液中的乙醇及乙酸乙酯含量。

1.3.2.2 酵母菌功能菌株共培养体系的培养条件优化及酿酒发酵试验

选择1株高产乙醇的酵母菌和1株高产乙酸乙酯的酵母菌为共培养出发菌株,以种子培养基为基础培养基,按表1设定的培养条件进行优化酵母菌共培养体系培养条件的正交试验。

表1 按 $L_{16}(4^5)$ 正交表设计酵母菌混合培养体系

水平	pH	温度/℃	溶氧	培养时间/h
1	3	28	A	12
2	4	33	B	24
3	5	37	C	36
4	6	41	D	48

注:A代表厌氧培养,B代表静置培养,C代表间歇搅拌培养,D代表摇床培养。

获得各种共培养物后,镜检,以3%接种量分别接种发酵培养基,23℃~25℃静置发酵4 d,测定发酵液中乙醇及乙酸乙酯含量。分别以乙醇和乙酸乙酯为指标进行方差分析,确定酵母菌共培养条件。

1.3.3 酵母菌功能菌株共培养体系对传统老陈醋酿酒过程的影响

对照组采用传统山西老陈醋酿酒工艺,按照规定比例混合高粱、大曲和水,每缸装料2 kg,按工艺要求控制室温在23~25℃,发酵周期为18 d。试验组在酿酒试验开始时,按3%的接种量加入酵母菌功能菌株共培养物,其余工艺参数同传统生产工艺。对照组与试验组均施行3个平行试验。

发酵结束后,应用气相色谱法检测发酵液中的乙醇和乙酸乙酯的含量,并测定发酵醪的初糖和残糖。对试验数据进行综合分析,评价该酵母菌共培养体系对传统老陈醋酿酒过程的影响。

1.3.4 功能菌株的分类鉴定

依照《酵母菌的特征与鉴定手册》^[2],进行酵母菌Nz9.8和Nz19.3的形态观察和生理生化试验,查阅种属检索表,确定供试菌的分类地位。

1.3.5 测定方法

(1)酒醪中乙醇及乙酸乙酯的气相色谱测定^[3,4]。

(2)总糖测定:样品经6 mol/L HCl酸水解30 min后,用3,5-二硝基水杨酸比色定糖法测定^[5]。

2 实验结果

2.1 酵母菌功能菌株的筛选

老陈醋大曲菌悬液经过富集培养后,共分离到40株酵母菌。经镜检观察,其细胞形态呈腊肠状和圆球状两种类型,细胞直径约5~8 μm。通过发酵试验检测乙醇及乙酸乙酯产量,发现这些菌株表现出3种生理学类型:即乙醇产量高而乙酸乙酯产量低、乙醇产量低而乙酸乙酯产量高、乙醇和乙酸乙酯产量均低。表2列出了9株生产性状优良的代表性菌株的细胞形态与生产性状。

2.2 酵母菌功能菌株体系的构建及生产性状测试

2.2.1 酵母菌功能菌株的纯培养及混合酿酒发酵试验

取乙醇高产株Nz19.3与Nz19.5和乙酸乙酯高产株Nz9.8与Nz19.1,依筛选条件分别培养种子液,镜检、计数,以Nz19.3:Nz9.8、Nz19.5:Nz19.1组成2个组合,按设定比例混合后进行发酵。结果见表3。

试验结果表明,2个不同生理类型酵母功能菌的纯培养物组合,无论以何种细胞比例混合,发酵时均得到较高的乙醇产量,而乙酸乙酯的产量极低,显然乙酸乙酯高产株没有发挥作用。

2.2.2 酵母菌功能菌株共培养体系的培养条件优化及酿酒发酵试验

表 2 乙醇与乙酸乙酯高产酵母菌株的细胞形态及生产性状

菌株编号	富集培养温度/℃	菌体形态	乙醇体积分数/%	乙酸乙酯体积分数/%	备注
Nz4.4	28	腊肠状	2.40	0.280	乙酸乙酯高产株
Nz9.8	37	腊肠状	3.20	0.429	乙酸乙酯高产株
Nz19.1	28	腊肠状	4.40	0.393	乙酸乙酯高产株
Nz19.2	28	腊肠状	2.90	0.280	乙酸乙酯高产株
Nz27.4	33	腊肠状	5.10	0.335	乙酸乙酯高产株
Nz4.3	28	腊肠状	12.5	0.004	乙醇高产株
Nz9.7	37	腊肠状	12.5	0.008	乙醇高产株
Nz19.3	28	圆球状	14.4	0.008	乙醇高产株
Nz19.5	28	圆球状	13.0	0.0037	乙醇高产株

表 3 功能酵母菌纯培养后混合发酵试验

菌株组合	比例	乙醇体积	乙酸乙酯
		分数/%	体积分数/%
Nz19.3:Nz9.8	4:6	14.1	0.003
	6:4	14.3	0.004
	8:2	13.7	0.003
Nz19.5:Nz19.1	4:6	12.2	0.003
	6:4	12.8	0.003
	8:2	12.0	0.002

挑选乙醇产量最高菌株(Nz19.3)和乙酸乙酯产量最高菌株(Nz9.8)作为共培养体系的出发菌株,依照设计方案进行优化共培养条件的正交试验。试验结果的方差分析见表 4 和表 5。

表 4 以乙醇为检验指标的正交试验分析表

方差来源	偏差平方和(S)	自由度(f)	F 值	显著性
pH	12.59	3	1.54	
温度	70.69	3	8.67	**
溶氧	5.86	3	0.71	
培养时间	3.93	3	0.48	
误差	8.15	3		

从方差分析表可以看出,pH、溶氧和培养时间对酵母菌共培养体系合成乙醇和乙酸乙酯的能力影响

表 6 酵母菌共培养体系对传统老陈醋酿酒过程的影响试验

工艺	乙醇体积	乙酸乙酯	初糖质量	残糖质量	糖醇	乙醇产量	乙酸乙酯产量	糖醇转化率
	分数/%	体积分数/%	浓度/%	浓度/%	转化率/%	提高率/%	提高率/%	提高率/%
传统工艺	5.20	0.01%	17.2	6.7	39.1	对照	对照	对照
优化工艺	5.93	0.02%	17.2	7.1	46.4	14	100	18.6

从表 6 可以看出,优化后的酿酒工艺与传统工艺相比较,乙醇产量提高了 14%,乙酸乙酯产量提高了一倍,糖醇转化率提高 18.6%。表明构建的共培养体系对于改善山西老陈醋的酿酒过程是非常有效的。

2.4 酵母菌 Nz9.8 和 Nz19.3 的分类鉴定

Nz9.8 菌株的生理生化特征呈现 D-葡萄糖发酵试验阳性,赤藓糖醇生长试验阴性,D-甘露醇生长试验阳性,硝酸盐生长阳性,麦芽糖生长试验阳性,棉子

不显著,而温度的影响极显著。进一步对正交试验结果进行分析表明,在供试温度范围内,酵母菌共培养体系的培养温度越低,发酵时的乙醇产量越高,而培养温度越高则发酵液中的乙酸乙酯含量越高。

表 5 以乙酸乙酯为检验指标的正交试验分析表

方差来源	偏差平方和(S)	自由度(f)	F 值	显著性
pH	1238	3	1.69	
温度	6583	3	9.01	**
溶氧	1062	3	1.45	
培养时间	1060	3	1.45	
误差	730	3		

综合考虑生产中对乙醇和乙酸乙酯的产量要求,确定最佳培养条件为 pH 4、温度 33℃、摇床培养 24h。镜检该培养条件制备的共培养物发现存在球状和腊肠状两种菌体形态。经发酵培养基检验其发酵能力,乙醇体积分数可达 14%,乙酸乙酯达 0.02%,较纯种 Nz19.3 的乙酸乙酯积累量提高了 1.5 倍。

2.3 酵母菌功能菌株共培养体系对传统老陈醋酿酒过程的影响

以 Nz9.8 和 Nz19.3 共培养物优化老陈醋传统酿酒工序,试验结果见表 6。

糖生长试验阳性,D-半乳糖生长试验阳性,L-山梨糖生长试验阴性,2-酮-D-葡萄糖酸生长试验阴性。Nz19.3 菌株的生理生化特征呈现 D-葡萄糖发酵试验阳性,赤藓糖醇生长试验阴性,D-甘露醇生长试验阴性,蔗糖生长试验阴性,D-半乳糖生长试验阴性,纤维二糖生长试验阴性,琥珀酸生长试验阴性,无吡哆醇生长试验阳性,DL-乳酸生长试验阴性,2-酮-D-葡萄糖酸生长试验阴性,硝酸盐生长试验阴性,

0.01% 放线菌酮生长试验阴性, L- 赖氨酸生长阴性, 尿素水解试验阴性。依照试验结果, 按《酵母菌的特征与鉴定手册》中的检索表将 Nz9.8 菌株鉴定为汉逊酵母属的异常汉逊酵母 (*Hansenula anomala*), 而将 Nz19.3 菌株鉴定为酵母菌属的酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*)。

3 讨论

山西老陈醋的酿造过程是一种典型的多种微生物的混合发酵过程。混合发酵的必要条件是参与发酵的微生物之间必须具有生存相容性与代谢协调性^[6,7], 老陈醋大曲微生物正是这样一个特定的微生物群体。在这个群体中含有各种代谢类型的功能菌, 其丰富的代谢产物使产品质量优良、营养丰富、风味独特, 其适口性是纯种微生物生产的同类产品所不能比拟的。然而并非所有老陈醋大曲微生物都是产品生产必需的功能菌, 这就造成原料的代谢分流, 进而导致了出品率低和成本高的结果。因此, 要保留与发展山西老陈醋品牌产品, 既要坚持混合发酵的生产方式, 又要构建合理的功能微生物群落, 方有可能稳定、高效、定向地生产优质产品。

由实验结果可以看出, 来自老陈醋大曲的乙醇高产酿酒酵母 Nz19.3 和乙酸乙酯高产异常汉逊酵母 Nz9.8 在共培养体系中具有较好的相容性。同时, 由它们构建的酵母菌共培养体系与老陈醋大曲微生物之间也不存在拮抗作用。酵母菌共培养体系不仅在酿酒发酵试验中表现出同时高产乙醇与乙酸乙酯的生产性状, 而且在返回传统老陈醋酿酒过程中确实起

到了增加产量、提高质量的作用。但是, 同样应用 Nz19.3 和 Nz9.8 这 2 株酵母菌, 若将其纯培养物按比例混合后进行发酵, 发酵液中的乙酸乙酯含量却很低。其原因可能是两株功能酵母菌共培养时存在某种代谢互作机理, Nz19.3 菌株某种代谢产物会促进 Nz9.8 菌株合成乙酸乙酯, 但详细机理有待进一步研究。

本文的实验结果证明了通过人工构建土著功能菌的共培养体系, 改善原有微生物的群落结构, 提高传统酿造产品的产量与质量是一条可行的途径。然而, 这只是一次探索性的研究, 要构建老陈醋功能菌共培养体系和建立有效、定向的代谢调控技术, 有待应用现代微生物学、分子生物学及分子生态学技术进行艰苦卓绝的深入研究。

参考文献

- 1 Jeffrey N Strathern, Elizabeth W Jones. The molecular biology of the yeast *saccharomyces*, life cycles and inheritance, Cold Spring Harbor Laboratory, 1981. 415~444
- 2 胡旭卿(译). 酵母菌的特征与鉴定手册[M]. 青岛: 青岛海洋大学出版社, 1991.6
- 3 Grlb R I. Modern practice of Gas Chromatography, New York, 1985, P. 589
- 4 熊裕堂, 张银文. 山西老陈醋微量酯香成分的液上气相色谱快速定量分析[J]. 食品与发酵工业, 1993(6): 45~49
- 5 北京大学生物系生物化学教研室编. 生物化学实验指导[M]. 北京: 高等教育出版社, 1989. 22~24
- 6 李春笋, 郭顺星. 微生物混合发酵的研究及应用[J]. 微生物学通报, 2004(3): 156~161
- 7 刘长海. 多菌种混合发酵糯米饮料的研究[J]. 食品工业科技, 2003(6): 43~45

Study on the Mixed-culture System of Yeasts in Shanxi Overmature Vinegar

Liang Lirong Lv Lihua Zhao Liangqi

(Chemical Biology and Molecular Engineering Laboratory of Education Ministry, Shanxi University, Taiyuan 030006, China)

ABSTRACT 9 strains of high alcohol-producing or high ethyl acetate-producing yeasts were isolated from koji of Shanxi overmature vinegar at different temperatures. One high alcohol-producing yeast Nz19.3 and one high ethyl acetate-producing yeast Nz9.8 were identified as *Saccharomyces cerevisiae* and *Hansenula anomala*, respectively. Then the optimal mixed-culture conditions of Nz9.8 and Nz19.3 were studied by $L_{16}(4^5)$ orthogonal design, and the results were as following: wort zymotic medium, pH 4.0, 33℃, rotate speed 80 r/min using a shaker. B using the mixed-culture system, It is seen that the concentration of alcohol and ethyl acetate was 5.93% and 0.02%, respectively. When the mixed-culture system was used to the traditional technology of Shanxi overmature vinegar with 3% inoculum, the yield of alcohol was increased by 14%, the conversion rate of alcohol to sugar was increased by 18.6%, and the content of ethyl acetate was doubled. The result shows that the mixed-culture system of yeasts can optimize microbial community structure, and can increase the yield and the quality of Shanxi overmature vinegar.

Key words Shanxi overmature vinegar, yeast, mixed culture, alcohol, ethyl acetate