

白酒酒醅高产酯酵母筛选鉴定及其发酵性能研究

Screening, identification and fermentation performance of a high-yield yeast from fermented grains of Dukang wine

刘建学^{1,2} 刘金科¹ 李璇^{1,2} 韩四海^{1,2}

LIU Jian-xue^{1,2} LIU Jin-ke¹ LI Xuan^{1,2} HAN Si-hai^{1,2}

李佩艳^{1,2} 徐宝成^{1,2} 郭金英^{1,2} 罗登林^{1,2}

LI Pei-yan^{1,2} XU Bao-cheng^{1,2} GUO Jin-ying^{1,2} LUO Deng-lin^{1,2}

(1. 河南科技大学食品与生物工程学院, 河南 洛阳 471023;

2. 河南省食品原料工程技术研究中心, 河南 洛阳 471023)

(1. College of Food and Bioengineering, Henan University of Science and Technology, Luoyang, Henan 471023, China; 2. Henan Engineering Research Center of Food Material, Luoyang, Henan 471023, China)

摘要:采用平板培养法从浓香型白酒酒醅中分离酵母,筛选其中具备耐受性良好的产酯酵母,并结合形态学、生理生化试验及26S rDNA分子生物学鉴定筛选酵母,研究筛选酵母与酿酒酵母混合发酵的发酵特性。结果表明,在模拟白酒酿造环境耐受性试验中,3株高产酯酵母均具有一定的耐酸性,且在乙醇浓度为10%时保持较好的生长特性,但在温度为40℃时生长特性均受到抑制,而酵母菌株W5相较于其他两株高产酯酵母耐受性能更好,经鉴定为戴尔有孢圆酵母(*Torulaspora delbrueckii*);在筛选酵母与酿酒酵母模拟白酒发酵试验中,酿酒酵母发酵速率最快,发酵时间为6 d;*T. delbrueckii* W5发酵时间为8 d;二者混合发酵时间为9 d。在相同的培养条件和发酵条件下,*T. delbrueckii* 纯培养方式下酸度较其他两种培养方式高,其酸度范围为7.62~7.72 g/L,说明*T. delbrueckii*产酸能力很高。但*T. delbrueckii* W5挥发酸产量较酿酒酵母低,其挥发酸范围为0.32~0.48 g/L。另外酿酒酵母纯培养乙醇含量为13.18%~13.50%,说明酿酒酵母相较于*T. delbrueckii*具有强发酵能力,二者之间混合发酵可以提高*T. delbrueckii*单独发酵产乙醇能力。可见,戴尔有孢圆酵母虽使发酵时间稍微延长,但产酸和产乙醇能力大大增强,可提高产量和丰富酒香。

关键词:酒醅;产酯酵母;混菌发酵;发酵性能

Abstract: The yeast was isolated from the strong flavor wine fer-

mented grains by plate culture method, and the ester-producing yeast with good tolerance was screened, through morphological characteristics, physiological and biochemical tests, and molecular biology analysis of 26S rDNA in yeast. Finally, the effects of mixed fermentation of yeast and *Saccharomyces cerevisiae* on simulated liquor fermentation broth were studied. The results showed that in the tolerance test of simulated liquor brewing environment, the three strains of high-yield esterifying yeast all had certain acid resistance, and maintained good growth characteristics when the concentration of ethanol was 10%, but the growth characteristics were inhibited when the temperature was 40℃, and the yeast strain W5 had better tolerance than the other two strains of high-yield esterifying yeast, which was identified as *torulaspora Delbrueckii*; in the simulated liquor fermentation experiment of screening yeast and *S. cerevisiae*, the fermentation rate of *S. cerevisiae* was the fastest, with the fermentation for 6 days; the single fermentation time of *T. delbrueckii* W5 was 8 days; the mixed fermentation of *T. delbrueckii* and *S. cerevisiae* prolonged the fermentation cycle, and the fermentation time was 9 days. Under the control of the same conditions of cultivation and fermentation, the acidity of *T. delbrueckii* pure culture was higher than that of the other two culture methods, and its acidity ranged from 7.62 g/L to 7.72 g/L, indicating that *T. delbrueckii* had a high acid production capacity. However, the yield of *T. derbrueckii* W5 was lower than that of *S. cerevisiae*, and the range of its volatile acid was 0.32~0.48 g/L. In addition, the ethanol content in pure culture of *S. cerevisiae* was 13.18%~13.50%, which showed that *S. cerevisiae* had strong fermentation ability compared with *T. delbrueckii*. In view of the excellent ester-producing properties of

基金项目:河南省科技攻关项目(编号:172102310694);河南省自然科学基金项目(编号:19A550001)

作者简介:刘建学(1964—),男,河南科技大学教授,博士。

E-mail: jx_liu@163.com

收稿日期:2020-05-02

T. delbrueckii, it was intended to provide a theoretical basis for its application in the production of the strong flavor wine. It was found that *T. delbrueckii* slightly prolonged the fermentation time, while the ability to produce acid and ethanol was greatly enhanced, and this could increase the yield and enrich the wine aroma.

Keywords: fermented grains; *Torulaspora delbrueckii*; mixed fermentation; fermentation performance

浓香型白酒发展历史悠久,占据白酒行业 70% 以上,通常采用以大曲为主要糖化剂的典型自然固态发酵法生产,形成窖香浓郁、香味协调等风味特点^[1]。但在实验室模拟白酒固态发酵工艺存在诸多局限性,诸如发酵参数的检测和控制,大多数是通过液态发酵来研究白酒微生物之间的作用。如 Wu 等^[2-3]分析酿酒酵母、异常毕赤酵母和东方伊萨酵母组合发酵方式,最终可以生产出具有汾酒特征的产品。近年来,白酒的功能微生物如酵母菌、酵母菌和乳酸菌、酵母菌属之间已被广泛研究,其数据可以成功地应用于提高发酵液的稳定性和感官特性^[4-6]。

作为白酒风味贡献的主要功能微生物,酵母菌可分为酿酒酵母和非酿酒酵母。其中非酿酒酵母中的产酯酵母可为白酒带来香味的复杂性,丰富白酒的风味物质^[7-10]。戴尔有孢圆酵母(*Torulaspora delbrueckii*, *T. delbrueckii*)是一种典型的产香酵母,能够产生 2-苯乙醇、2-氨基苯乙酮、乙酸戊酯等风味物质^[11-13],同时也具有很高的环境耐受性^[14]。*T. delbrueckii* 具有优良的发酵特性,在果酒中应用广泛,通过不同的接种方式可研究 *T. delbrueckii* 对果酒挥发性物质生成的影响^[15-17]。

目前,虽然 *T. delbrueckii* 已广泛应用于果酒类发酵,但在白酒发酵中的应用研究很少。研究拟通过筛选本土优良产酯特性的 *T. delbrueckii*,研究其在模拟白酒发酵的发酵特性,旨在为本土 *T. delbrueckii* 在浓香型白酒生产中的应用提供指导。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

样品:酒醅采于豫南某浓香型白酒生产车间,为窖池中糟醅上、中和下层糟醅等量混合,实验室 -20 °C 冷冻保存;

菌株:安琪白酒高活性酿酒酵母(鉴定为酵母属酿酒酵母),安琪酵母有限公司;

YPD 培养基、YEPD 培养基:按文献^[18]配制;

WL 培养基:按文献^[19]配制;

生理生化培养基:按文献^[20]²²⁻²³ 配制;

产酯培养基:按文献^[7]配制;

葡萄糖:分析纯,江苏强盛功能化学股份有限公司;

胰化蛋白胨:英国 OXOID 公司;

琼脂粉:上海蓝季科技发展有限公司;

氯化钠、氢氧化钠:分析纯,西陇化工股份有限公司;

Taq Plus DNA 聚合酶:酶活 5 U/ μ L,上海生工股份有限公司。

1.2 仪器与设备

立式蒸汽灭菌锅:LDZX-50KB 型,上海申安医疗器械厂;

电热恒温培养箱:SW-CJ-1D DH360BS 型,上海坤天实验仪器有限公司;

数码显微镜:BA210 型,北京瑞科中仪器有限公司;

可见分光光度计:722N 型,上海驰唐实业有限公司;

冰箱:BCD-312WDPV 型,山东青岛海尔股份有限公司;

PCR 仪:Verity 96well 型,美国 ABI 公司;

电泳仪:DYY-6C 型,北京六一仪器厂。

1.3 方法

1.3.1 菌株筛选 将酒醅研磨后称取 25 g 至 225 mL 无菌生理盐水,加灭菌玻璃珠于 200 r/min、28 °C 振荡 30 min。移取振荡培养液 1 mL 至 9 mL 生理盐水中进行梯度稀释,将 10^{-3} 、 10^{-4} 、 10^{-5} 稀释液在 YEPD 培养基和 WL 培养基上(两种培养基均加入 0.008 g/L 的氯霉素,防止细菌污染)进行平板涂布培养,每个梯度做 3 个平行,于 28 °C 恒温培养。挑选单菌落,观察单菌落特征,如菌落大小、颜色、色泽等,并在 40 倍显微镜下观察酵母菌水浸片和染色片,将符合酵母菌落特征的单菌落在 YEPD 培养基上划线分离 3 次,斜面保藏,并将分离纯化单菌落经液体培养后于 -20 °C 甘油保藏。

酵母产酯能力筛选:将分离纯化酵母菌接种到产酯培养基上,酵母菌接种量为 5%,培养条件为 30 °C、200 r/min 振荡培养 4 d,利用皂化回流法测定酵母产总酯含量。

1.3.2 菌种生理生化鉴定 对筛选酵母菌进行糖发酵试验、氮源同化试验、碳源同化试验、类淀粉试验、脲酶试验,并参照《酵母菌的特征与鉴定手册》^[20]¹⁸⁻²⁰ 进行鉴定判断。

1.3.3 菌种生长曲线测定 取所筛选酵母菌置于 YPD 液体培养基中,30 °C 静止培养培养 24 h,每隔 1 h 取发酵液测定其 $OD_{600\text{ nm}}$ 值,以时间为横坐标、 $OD_{600\text{ nm}}$ 值为纵坐标绘制酵母菌生长曲线。

1.3.4 菌株耐受特性分析

(1) 酵母的耐温性试验:将活化后的酵母菌按 5% 的接种量接种到 100 mL YPD 液体培养基中,分别置于 30, 35, 40 °C 恒温培养箱中培养,测定其培养 24 h 时的 $OD_{600\text{ nm}}$ 值,每组试验 3 个平行。

(2) 酵母的耐 pH 试验:将活化后的酵母菌按 5% 接种量接种到灭菌后调节 pH 为 3.5, 4.0, 4.5, 5.0 的 100 mL YPD 液体培养基中,测定其培养 24 h 时的 $OD_{600\text{ nm}}$ 值,每组试验 3 个平行。

(3) 酵母的耐乙醇试验:将活化后的酵母菌按 5% 接种量接种到灭菌后调节乙醇体积分数为 6%, 8%, 10%, 12% 的 100 mL YPD 液体培养基中,测定其培养 24 h 时的 $OD_{600\text{ nm}}$ 值,每组试验 3 个平行。

1.3.5 菌株分子生物学鉴定 酵母菌株 26S rDNA D1/D2 区序列分析方法:对筛选出的酵母菌株进行离心提取 DNA 后,进行 PCR 扩增,使用正向引物 NL-1: 5'-GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG-3', 反向引物 NL-4: 5'-GGTCCGTGTTTCAAGACGG-3' [21] 进行 26S rDNA D1/D2 区的目的片段扩增。PCR 循环为:94 °C 预变性 5 min, 94 °C 变性 30 s, 55 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 1 min, 循环 30 次; 72 °C 保持 5 min。将得到的 PCR 产物交由上海生工生物工程股份有限公司进行纯化和测序。将测序序列在 NCBI 数据库中进行同源性检索,通过 MEGA 软件构建系统发育树。

1.3.6 模拟发酵试验

(1) 结合菌株拮抗试验:采用双层琼脂法 [22], 将 10 μL 的戴尔有孢圆酵母、酿酒酵母的培养液分别与 10 mL 灭菌后的半固体 YPD 培养基混合均匀后,立即倒入下层琼脂培养基皿中,待凝固后放入牛津杯,每个牛津杯中加入 100 μL 稀释至一定梯度的菌液,28 °C 培养 24 h 后观察牛津杯周围是否出现抑菌圈,若未出现抑菌圈说明本底菌与接种菌株无拮抗作用;反之,则说明 2 种菌之间存在拮抗作用。

(2) 混菌发酵流程:取采自杜康酒业有限公司酿酒原料加蒸馏水糊化,糊化后加糖化酶糖化 3 h,再加入 α -淀粉酶酶解 3 h,过滤分装并调节糖度,最后经高压蒸汽灭菌后备用。纯培养加入 *T. delbrueckii* W5 10^6 CFU/mL、酿酒酵母 300 mg/L。混合发酵先加入 *T. delbrueckii* W5 10^5 CFU/mL, 2 d 后加入酿酒酵母 150 mg/L。发酵液置于 28 °C 恒温培养箱恒温培养,每隔 24 h 进行理化指标测定。根据 DNS 法 [23] 测定发酵液还原糖含量,苯酚-硫酸法 [24] 测定发酵液总糖含量,按 GB/T 10345—2007《白酒分析方法》测定发酵液乙醇含量、酸度、pH。菌落总数的测定采用稀释涂布法,在 WL 培养基上培养计数 [25]。当发酵完全,即发酵液重量连续 3 d 减少重量不变时,取发酵液进行挥发性物质测定,挥发性物质经萃取后采用气质联用仪进行测量。

1.4 数据处理

利用 Microsoft Excel 2013 和 SPSS Statistics 17.0 对样本 ($n=3$) 所得数据进行基本处理,Origin 2017 进行图形绘制。

2 结果与分析

2.1 酵母形态及培养特征

如图 1 所示,经分离的酵母单菌落为乳白色,菌落质地均匀,正反两面、边缘和中央部位的颜色都很均一,菌

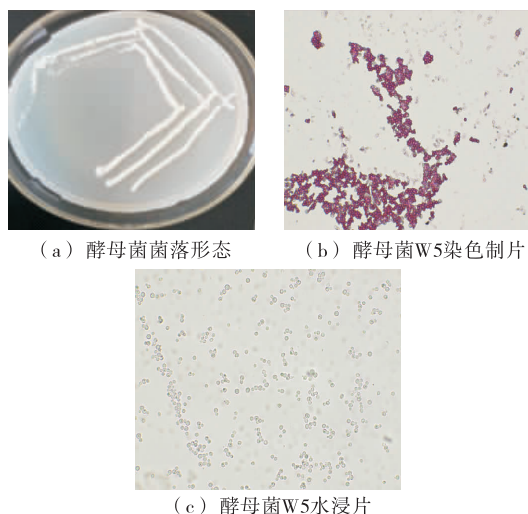


图 1 酵母菌的菌落形态图片和镜检图片

Figure 1 Colony morphology and microscopy of yeast

落表面湿润、光滑、黏稠,容易挑起;菌体为圆形、椭圆形,且生殖方式为出芽生殖,与酵母菌的基本特征符合 [25]。

2.2 酵母菌的二级筛选

对酒醅中分离的酵母进一步筛选,将初步分离的疑似酵母菌株进行产酯能力复筛,得到如图 2 所示结果,菌株 Y1、M3、W5 产总酯含量均超过 2.0 g/L,其中 W5 产总酯含量最高,其为 2.479 g/L。研究 [16,26] 表明,优质的产酯酵母可以在酯酶的作用下产生众多的酯类物质,除去酒类的杂味,改善酒类的品质。王鹏昊等 [27] 从酿酒小曲中分离优质产酯酵母,经产酯培养基筛选其总酯为 2.684 g/L。因此选用 Y1、M3、W5 3 株菌株进行下一步试验。

2.3 酵母菌的生理生化特性

2.3.1 酵母菌生长曲线 由图 3 可知,在同样初始接种量的情况下,菌株 Y1 在培养 4 h 左右进入对数生长期,菌株 M3 和 W5 在培养 6 h 时进入对数生长期,菌株 Y1、W5 达到平稳期的 $OD_{600\text{ nm}}$ 值明显高于 M3,而且菌株 Y1 和 M3 在培养 16 h 后就已经达到平稳期,而菌株 W5 是在培养 24 h 后才逐渐达到平稳期,所以从生长状况来看菌株 W5 要优于菌株 Y1 和 M3。

2.3.2 酵母菌生理生化特性 参照《酵母菌的特征与鉴定手册》 [20] 18—20 对筛选酵母菌进行生理生化特性鉴定,分别进行糖发酵试验、碳源同化试验、氮源同化试验、产类淀粉试验及脲酶试验,结果见表 1。糖发酵试验结果表明,菌株 Y1 能够发酵葡萄糖、乳糖和蔗糖,不能发酵麦芽糖和半乳糖;菌株 M3 也能发酵葡萄糖和蔗糖,不能发酵麦芽糖、乳糖和半乳糖;菌株 W5 只能发酵蔗糖。碳源同化试验结果表明,筛选得到的菌株 Y1、M3、W5 均能够利用淀粉、葡萄糖、麦芽糖和蔗糖,但不能利用乳糖和柠檬酸。氮源同化试验结果表明,筛选出的 3 种酵母菌对硫

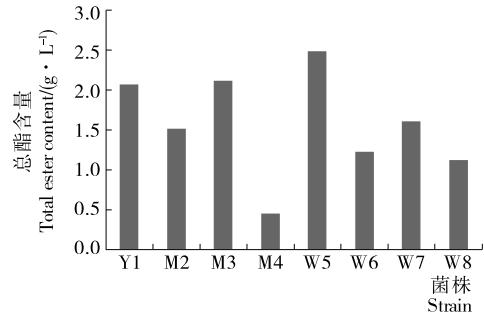


图2 不同菌株产总酯含量

Figure 2 Total ester content of different strains

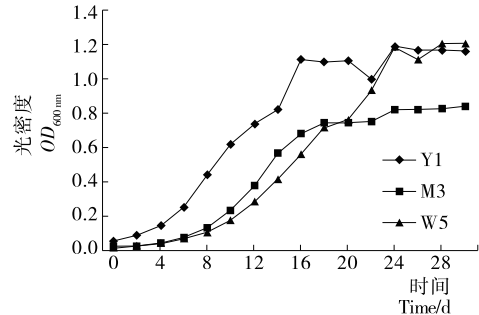


图3 3株酵母菌的生长曲线

Figure 3 Growth curves of three yeast species

表1 菌株生理生化试验结果[†]

Table 1 Physiological and biochemical characteristics of strain

菌株	脲酶试验	类淀粉试验	碳源同化试验					柠檬酸
			葡萄糖	麦芽糖	淀粉	乳糖	蔗糖	
Y1	—	—	+	+	+	—	+	—
M3	—	—	+	+	+	—	+	—
W5	—	—	+	+	+	—	+	—

菌株	糖发酵试验				氮源同化试验			
	葡萄糖	麦芽糖	乳糖	D-半乳糖	蔗糖	硝酸铵	亚硝酸钠	硝酸钾
Y1	+	—	+	—	+	+	—	+
M3	+	—	—	—	+	+	—	+
W5	—	—	—	—	+	+	—	+

[†] + 阳性, — 阴性。

酸铵、亚硝酸钠和硝酸钾的利用情况基本一致,菌株 Y1、M3、W5 都能利用硫酸铵和硝酸钾,不能利用亚硝酸钠。其他试验表明,筛选出的 3 株菌在生长代谢过程中均不能够产生类淀粉物质,且在脲酶试验中,酵母菌株均表现为阴性。

2.4 酵母菌生长特性研究

2.4.1 温度对酵母菌生长情况影响 如图 4 所示,温度为 30~40 ℃ 时,3 株菌均能生长,且菌株 W5 生长状况优于菌株 Y1 和 M3,但在温度为 40 ℃ 时三者生长受到抑制 ($OD_{600\text{ nm}}$ 值 <0.5),说明菌株 W5 具有一定的耐温性。在

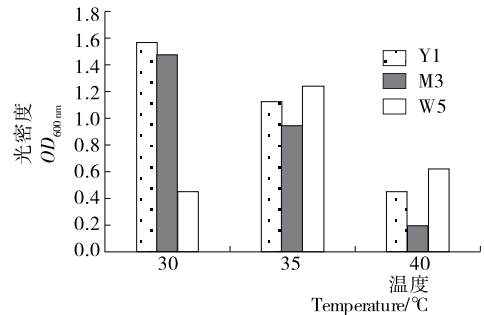


图4 温度对酵母菌生长情况的影响

Figure 4 Effect of temperature on yeast growth

浓香型白酒发酵过程中,发酵温度需控制在 30~40 ℃,这样浓香型白酒的酒质才能得到保障^[7]。

2.4.2 pH 对酵母菌生长情况影响 如图 5 所示,3 株酵母菌株均有很好的 pH 耐受性,当 pH 为 3.5 时 3 株酵母菌株均能正常生长,酵母菌的生长状况随酸度的增加而减弱,但仍能保持其生物活性。而且菌株 W5 生长状况优于菌株 Y1 和 M3。浓香型白酒发酵过程中由于产酸微生物的作用^[28],其发酵环境呈酸性,一株优良的酵母菌必须具有良好的 pH 耐受性才能更好地参与到白酒固态发酵过程中。

2.4.3 乙醇浓度对酵母菌生长情况影响 由图 6 可知,

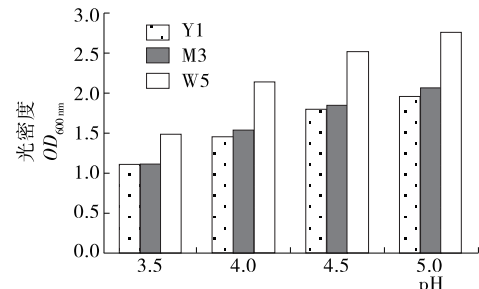


图5 pH 对酵母菌生长情况的影响

Figure 5 Effect of pH on yeast growth

3 株酵母在乙醇含量为 12% 时生长均受到抑制 ($OD_{600\text{ nm}} < 0.5$),但在乙醇浓度为 6%~10% 时菌株 W5 的生长状况优于菌株 Y1 和 W5,说明菌株 W5 具有一定的乙醇耐受性。李小龙等^[29]通过对白酒固态发酵过程中的微生物菌落演替研究发现,乙醇是菌落演替的最关键推动力,但随着发酵过程的继续,乙醇浓度升高,高浓度的乙醇会使酵母细胞产生毒效应,具有一定乙醇耐受性的酵母菌株在发酵过程中具有较高发酵特性。阳秀莲等^[30]通过筛选杨梅果酒中乙醇耐受性高的酵母菌株,可以辅助发酵为杨梅酒增香。

2.5 酵母菌分子鉴定结果

在 NCBI 里进行 Blast 序列比对,然后用 MEGA-X 软件中的邻接统计方法绘制菌株 W5 26S rDNA D1/D2 基因序列相关菌株的系统发育树。如图 7 所示,图中系统

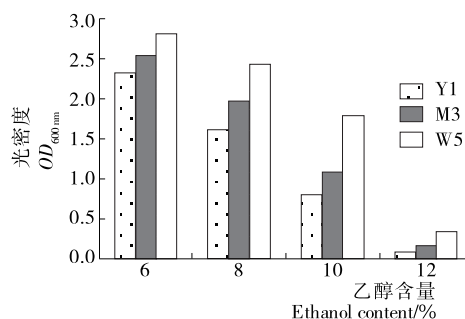


图 6 乙醇浓度对酵母菌生长情况的影响

Figure 6 Effect of ethanol concentration on yeast growth

发育树显示菌株 W5 与 MH794401.1 *Torulaspora delbrueckii* voucher UCASIM-2178 聚在一个分支上,是彼此的近亲。结合菌落形状、镜检结果和生化试验结果分析,

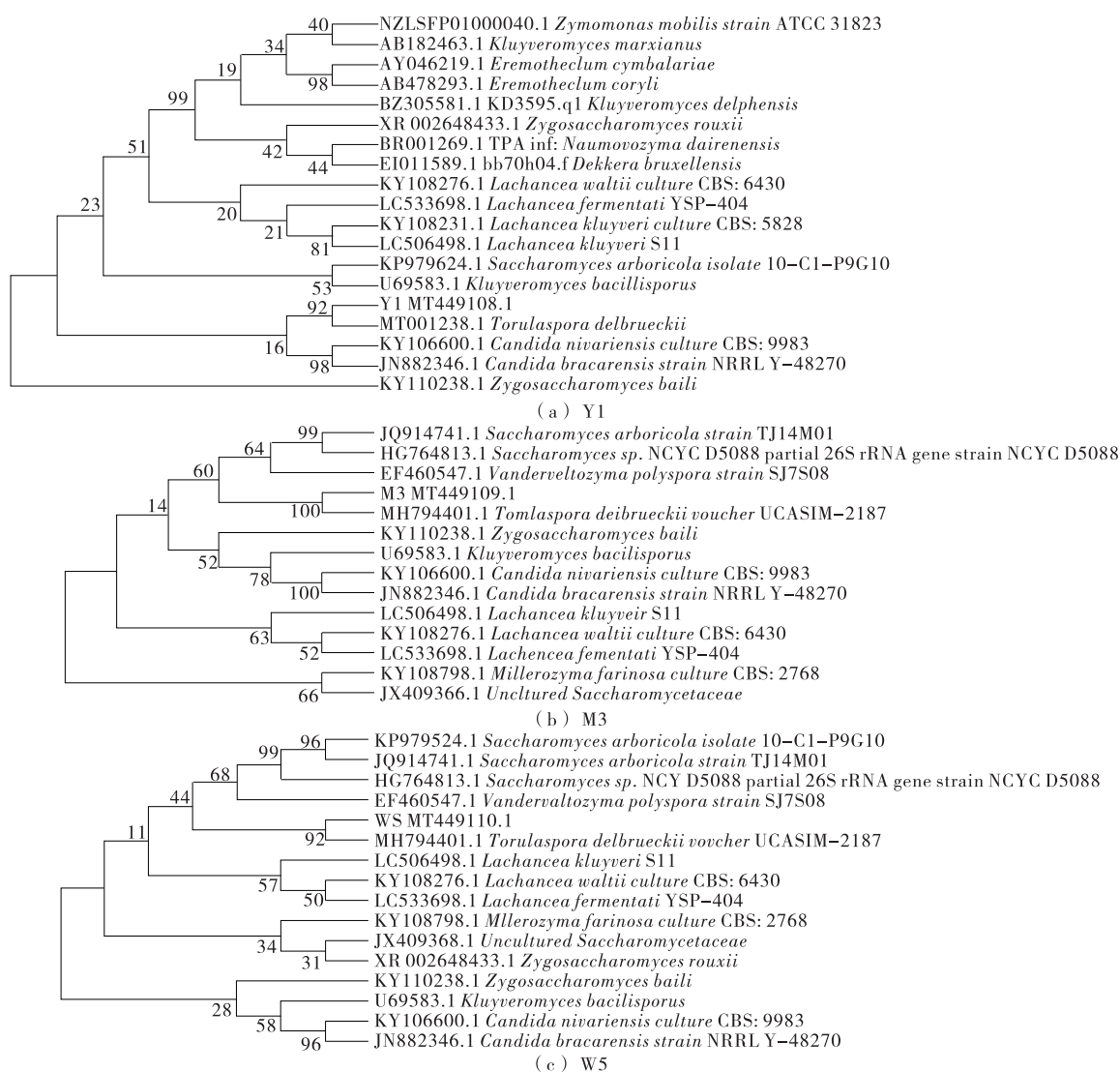


图 7 菌株 W5 26S rDNA D1/D2 基因序列其亲缘关系的邻接系统发育树

Figure 7 Neighbor-joining phylogenetic tree based on 26S rDNA D1/D2 gene sequence of strain W5 and its closest relative species

鉴定菌株 W5 属于戴尔凯氏有孢圆酵母 (*Torulaspora delbrueckii*)^{[20]20-22}。

2.6 混菌发酵理化特性

为防止混合发酵菌株之间存在抑制作用,影响其在发酵过程中的作用,对筛选酵母与酿酒酵母进行拮抗试验,结果表明酿酒酵母与 *T. delbrueckii* 之间无拮抗作用,牛津杯周围无抑菌圈出现,与空白组情况相同。因此,2 株酵母可以进行混合发酵。以具有良好耐受性且产酯性能高的酵母菌株 W5 与酿酒酵母混合模拟白酒发酵,研究其理化指标和挥发性物质。由图 8 可知,酿酒酵母发酵速率最快,发酵时间为 6 d;*T. delbrueckii* W5 单独发酵时间为 8 d;*T. delbrueckii* 与酿酒酵母混合发酵完成时间为 9 d,顺序接种中 *T. delbrueckii* 由于先加入而成为优势菌株,酿酒酵母加入时由于基质的消耗而增殖空间有限,可以极大发挥混合发酵中 *T. delbrueckii* 发酵特性,随着酿酒酵母的加入,二者之间的相互竞争关系使得发酵完成时间延后。

由图 9(a)可知,酿酒酵母菌落数呈现“S”型生长特征,菌落数在第 4 天达到峰值,酵母活细胞数为 7.7×10^7 CFU/mL,此后便开始下降。由图 9(b)可知,*T. delbrueckii* W5 纯培养第 3 天,酵母活细胞数达到峰值,说明 *T. delbrueckii* W5 能迅速适应白酒发酵环境。由图 9(c)可知,先加入的 *T. delbrueckii* W5 利用糖类迅速增殖,到第 2 天时 *T. delbrueckii* W5 已经成为优势菌株。此时随着酿酒酵母的加入,虽然酿酒酵母生长能力较 *T.*

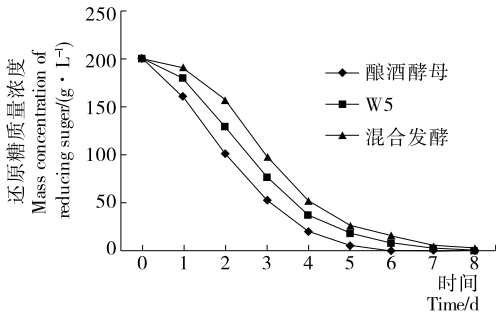
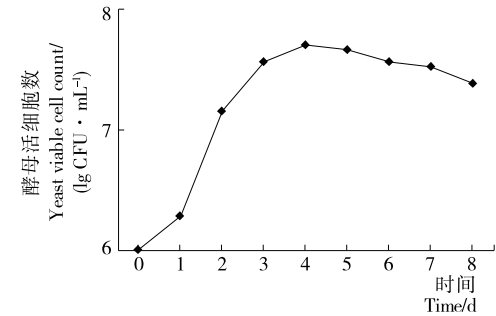


图 8 不同方式培养酵母时的还原糖变化

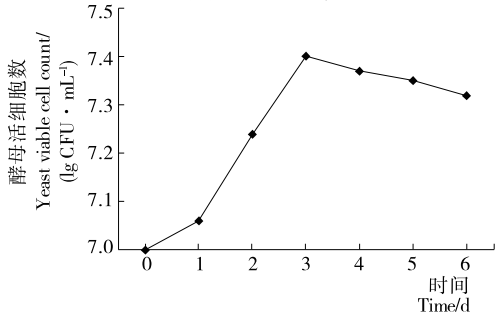
Figure 8 Changes in reducing sugar in different culture methods of yeast

delbrueckii W5 好,但 *T. delbrueckii* W5 由于数量优势受酿酒酵母影响较小。由于二者处于竞争关系,二者的活细胞数都较纯培养时低,酿酒酵母在第 5 天时活细胞数才达到峰值。

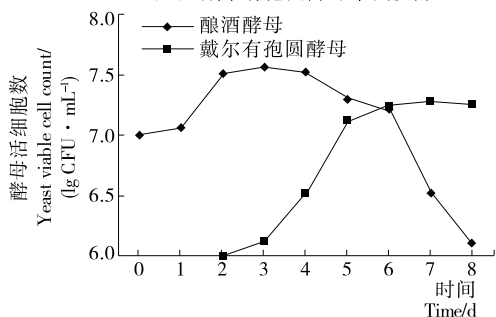
如表 2 所示,3 种发酵方式还原糖含量均小于 4 g/L,说明 3 种发酵均能完成。在相同的培养条件和发酵条件下,*T. delbrueckii* 纯培养方式下总酸度较其他两种培养



(a) 酿酒酵母单独发酵



(b) 戴尔有孢圆酵母单独发酵



(c) 酵母混合发酵

图 9 不同发酵方式酵母活细胞数变化

Figure 9 Changes in the number of viable cells in yeast in different fermentation modes

表 2 模拟发酵试验理化指标[†]

Table 2 Physical and chemical indicators of yeast fermentation experiment

菌株	还原糖含量/ (g · L ⁻¹)	总酸含量/ (g · L ⁻¹)	pH	乙醇含量/ %	挥发酸含量/ (g · L ⁻¹)
酿酒酵母	3.12 ± 0.13 ^{ab}	7.21 ± 0.04 ^a	2.62 ± 0.12 ^a	13.34 ± 0.16 ^b	0.42 ± 0.06 ^{ab}
W5	3.44 ± 0.07 ^b	7.68 ± 0.06 ^a	2.85 ± 0.08 ^a	10.55 ± 0.24 ^a	0.40 ± 0.08 ^b
混合酵母	2.80 ± 0.11 ^{ab}	6.81 ± 0.13 ^a	3.36 ± 0.06 ^{ab}	11.62 ± 0.14 ^a	0.49 ± 0.05 ^b

[†] 字母不同表示差异显著 (P < 0.05)。

方式高,其总酸含量为 7.62~7.72 g/L,说明 *T. delbrueckii* 单独发酵产总酸能力很高,乳酸为主的非挥发性酸类能增加白酒的敦厚感,适当的酸含量可以协调白酒的各种风味成分,提升白酒的口感。而混合发酵试验总酸含量得到显著减少,说明酿酒酵母的加入可以减少 *T. delbrueckii* 的产总酸量。另外 *T. delbrueckii* W5 挥发酸产量较另外两种发酵方式低,其挥发酸为 0.32~0.48 g/L,白酒当中挥发酸主要有甲酸、乙酸、丁酸等,挥发酸的含量可以直接影响到白酒的风味和质量,如乙酸强烈的酸味会使白酒风味变差。酿酒酵母纯培养乙醇含量为 13.18%~13.50%,说明酿酒酵母相较于 *T. delbrueckii* 单独发酵具有强发酵能力,二者之间混合发酵可以提高 *T. delbrueckii* 单独发酵产乙醇能力。

3 结论

(1) 获得一株高产酯酵母。从浓香型白酒酒醅中分离得到优势非酿酒酵母,通过浓香型白酒发酵条件耐受性筛选,经过分子生物学鉴定为戴尔有孢圆酵母。

(2) 发酵过程中菌种间有竞争关系。通过筛选酵母与酿酒酵母模拟白酒发酵试验,发现酿酒酵母发酵速率最快,发酵完成时间为 6 d, *T. delbrueckii* W5 单独发酵时间为 8 d,二者混合发酵时间为 9 d,延长了发酵完成时间,表明在混菌发酵过程中菌种间有竞争关系。

(3) 产酯能力。酸是生成酯类物质的前体物质,在相同培养和发酵条件下, *T. delbrueckii* 纯菌发酵方式其总酸含量较其他两种培养方式高,其总酸含量范围在 7.62~7.72 g/L,表明 *T. delbrueckii* 产酯能力高。同时,混菌发酵可以提高产乙醇能力,与目标菌种单一菌种发酵相比,由 10.55% 提高到了 11.62%。

戴尔有孢圆酵母在白酒生产中尚没有应用,所具有的高产酯能力仍需进一步研究,对其发酵性能的深入了解,有助于在白酒酿造中发挥其高产酯、高产乙醇的作用。

参考文献

- [1] YANG Shu-wen, ZHOU Zhi-jiang, HAN Ye, et al. Study on varieties of yeast in cellared mud used for brewing white alcohol[J]. Science & Technology of Food Industry, 2011, 32(5): 138-137.
- [2] WU Qun, ZHU Wei-an, WANG Wei, et al. Effect of yeast species on the terpenoids profile of Chinese light-style liquor[J]. Food Chemistry, 2015, 168: 390-395.
- [3] WU Qun, KONG Yu, XU Yan. Flavor profile of Chinese liquor is altered by interactions of intrinsic and extrinsic microbes[J]. Applied & Environmental Microbiology, 2015, 82(2): 422-427.
- [4] KONG Yu, WU Qun, ZHANG Yan, et al. In situ analysis of metabolic characteristics reveals the key yeast in the spontaneous and solid-state fermentation process of Chinese light-style liquor[J]. Applied & Environmental Microbiology, 2014, 80(12): 3 667-3 671.
- [5] MALIGOY M, MERCADE M, COCAIGNBOUSQUET M, et al. Transcriptome analysis of *Lactococcus lactis* in coculture with *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Applied & Environmental Microbiology, 2008, 74(2): 485-494.
- [6] MENG Xing, WU Qun, WANG Li, et al. Improving flavor metabolism of *Saccharomyces cerevisiae* by mixed culture with *Bacillus licheniformis* for Chinese Maotai-flavor liquor making[J]. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, 2015, 42(12): 1 601-1 608.
- [7] ZHANG Yan-yan, ZHU Xiao-yu, LI Xiang-zhen, et al. The process-related dynamics of microbial community during a simulated fermentation of Chinese strong-flavored liquor[J]. BMC Microbiology, 2017, 17(1): 196-202.
- [8] ZHA Mu-su, SUN Bao-guo, WU Yi-ping, et al. Improving flavor metabolism of, *Saccharomyces cerevisiae*, by mixed culture with, *Wickerhamomyces anomalus*, for Chinese Baijiu making[J]. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2018, DOI: 10.1016/j.jbiosc.2018.02.010.
- [9] LIU Mao-ke, TANG Yu-ming, GUO Xiao-jiao, et al. Deep sequencing reveals high bacterial diversity and phylogenetic novelty in pit mud from Luzhou Laojiao cellars for Chinese strong-flavor Baijiu[J]. Food Research International, 2017, 102: 68-76.
- [10] XU You-qiang, SUN Bao-guo, FAN Guang-sen, et al. The brewing process and microbial diversity of strong flavour Chinese spirits: A review[J]. Journal of the Institute of Brewing, 2017, 123(1): 5-12.
- [11] ADAME SOTO P J, ARECHIGA CARVAJAL E T, LOPEZ M G, et al. Potential production of 2-phenylethanol and 2-phenylethylacetate by non-Saccharomyces yeasts from *Agave durangensis*[J]. Annals of Microbiology, 2019, 69 (9): 989-1 000.
- [12] ALVAREZ-FERNANDEZ M A, FERNANDEZ CRUZ E, GARCIA PARRILLA M C, et al. *Saccharomyces cerevisiae* and *Torulaspora delbrueckii* intra- and extra-cellular aromatic amino acids metabolism[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2019, 67(28): 7 942-7 953.
- [13] CALLEJO M J, GARCÍA NAVAS J J, ALBA R, et al. Wort fermentation and beer conditioning with selected non-Saccharomyces yeasts in craft beers[J]. European Food Research and Technology, 2019, 245(6): 1 229-1 238.
- [14] RUIZ J, ORTEGA N, MARTIN-SANTAMARIA M, et al. Occurrence and enological properties of two new non-conventional yeasts (*Nakazawaea ishiwadae* and *Lodderomyces elongisporus*) in wine fermentations[J]. 2019, 305: 108 255-108 300.
- [15] WEI Jian-ping, WANG Shu-yu, ZHANG Yu-xiang, et al.

- Characterization and screening of non-Saccharomyces yeasts used to produce fragrant cider [J]. LWT-Food Science and Technology, 2019, 107: 191-198.
- [16] TONDINI F, LANG T, CHEN Liang, et al. Linking gene expression and oenological traits: Comparison between *Torulaspora delbrueckii* and *Saccharomyces cerevisiae* strains[J]. International Journal of Food Microbiology, 2019(294): 42-49.
- [17] MBUYANE L L, DE KOCK M, BAUER F F, et al. *Torulaspora delbrueckii* produces high levels of C-5 and C-6 polyols during wine fermentations[J]. Fems Yeast Research, 2018, 18(7): 84-88.
- [18] MARÍA L, RAYMOND E, CRISTINA R, et al. Isolation and identification of the indigenous yeast population during spontaneous fermentation of isabella (*Vitis labrusca* L.) grape must[J]. Food Microbiology, 2017, 8: 532.
- [19] FAN Guang-sen, SUN Bao-guo, XU Dai, et al. Isolation and identification of high-yield ethyl acetate-producing yeast from gujinggony Daqu and its fermentation characteristics[J]. Journal of the American Society of Brewing Chemists, 2018, 4(3): 117-124.
- [20] 巴尼特, 佩恩, 亚罗. 酵母菌的特征与鉴定手册[M]. 胡瑞卿, 译. 青岛: 青岛海洋大学出版社, 1991.
- [21] KURTZMAN P, ROBNETT J. Identification and phylogeny of ascomycetous yeasts from analysis of nuclear large subunit (26S) ribosomal DNA partial sequences[J]. Antonie van Leeuwenhoek, 1998, 73: 331-371.
- [22] 李亚东, 汪康游, 樊帅, 等. 海洋来源的 *D*-海因酶产生菌的分离及酶催化通道模拟分析[J]. 农业生物技术学报, 2016, 24(5): 729-737.
- [23] CRONIN D D, SMITH S. A simple and rapid procedure for the analysis of reducing, total and individual sugars in potatoes[J]. Potato Research, 1979, 22(2): 99-105.
- [24] DUBOIS M, GILLES K A, HAMILTON J K, et al. Colorimetric method for determination of sugars and related substances[J]. Analytical Chemistry, 1956, 28(3): 350-356.
- [25] 程雷, 李梓, 王军. 葡萄自然发酵过程中酵母菌的研究[J]. 中国食品学报, 2010, 10(2): 131-137.
- [26] OLIVEIRA I, FERREIRA V. Modulating fermentative, varietal and aging aromas of wine using non-saccharomyces yeasts in a sequential inoculation approach[J]. Microorganisms, 2019, DOI: 10.3390/microorganisms7060164.
- [27] 王鹏昊, 关统伟, 张习超, 等. 小曲中优质产酯酵母分离鉴定及其产酯条件优化[J]. 食品与发酵工业, 2018, 44(2): 62-67.
- [28] 王晖, 蒲叶, 李霁阳, 等. 白酒窖泥中乳酸菌分离鉴定及其发酵产挥发性风味物质比较[J]. 食品科学技术学报, 2020, 38(1): 26-35.
- [29] 李小龙, 吴群, 徐岩. 乙醇与酸度协同作用推动芝麻香型白酒固态发酵过程的微生物群落演替[J]. 微生物学通报, 2019, 46(1): 1-10.
- [30] 阳秀莲, 刘伟, 林树花, 等. 靖州杨梅果酒发酵菌种筛选、鉴定及发酵性能研究[J]. 食品与机械, 2019, 35(3): 41-47, 62.
- (上接第 27 页)
- [12] 贡汉坤, 焦云鹏. 鲟鱼下脚料蛋白质的回收及其凝胶特性研究[J]. 食品与机械, 2012, 28(5): 107-110.
- [13] NISHAD J, KOLEY T K, VARGHESE E, et al. Synergistic effects of nutmeg and citrus peel extracts in imparting oxidative stability in meat balls[J]. Food Research International, 2018, 106: S98648321.
- [14] JIA Na, ZHANG Feng-xue, LIU Qian, et al. The beneficial effects of rutin on myofibrillar protein gel properties and related changes in protein conformation[J]. Food Chemistry, 2019, 301: 125206.
- [15] KANG Zhuang-li, ZOU Yu-feng, XV Xing-lian, et al. Effect of a beating process, as a means of reducing salt content in Chinese-style meatballs (kung-wan): A physicochemical and textural study[J]. Meat Science, 2014, 96(1): 147-152.
- [16] GAO Xue-qin, HAO Xiu-zhen, XIONG Guo-yuan, et al. Interaction between carrageenan/soy protein isolates and salt-soluble meat protein[J]. Food & Bioprocess Processing, 2016, 100: 47-53.
- [17] VISSCHERS R W, DE JONGH H H J. Disulphide bond formation in food protein aggregation and gelation[J]. Biotechnology Advances, 2005, 23(1): 75-80.
- [18] 袁凯, 张龙, 谷东陈, 等. 基于漂洗工艺探究白鲢鱼糜加工过程中蛋白质氧化规律[J]. 食品与发酵工业, 2017, 43(12): 30-36.
- [19] 计红芳, 李莎莎, 张令文, 等. 豌豆蛋白对鸡肉糜热诱导凝胶品质特性与微观结构的影响[J]. 食品科学, 2020, 41(4): 74-79.
- [20] 孙皓, 徐幸莲, 王鹏. 鸡肉类 PSE 肉与正常肉流变、质构特性的比较[J]. 食品与发酵工业, 2013, 39(5): 194-199.
- [21] 薛思雯, 衣晓坤, 于小波, 等. 超高压处理僵直前肉肉对其斩拌肉糜流变特性及蛋白二级结构的影响[J]. 食品与发酵工业, 2019, 45(6): 77-82.
- [22] 杨玉玲, 周磊, 游远, 等. 氧化对肌原纤维蛋白热诱导凝胶质构特性及保水性的影响[J]. 中国农业科学, 2018, 51(18): 3 570-3 581.
- [23] BAO Yu-long, BOEREN S, ERTBJERG P. Myofibrillar protein oxidation affects filament charges, aggregation and water-holding[J]. Meat Science, 2018, 135: 102-108.
- [24] 张海璐, 黄翔, 杨燃, 等. 蛋白质氧化对羊肉糜流变与凝胶特性的影响[J]. 食品科学, 2020, 41(8): 8-13.